



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLÓGÍA E INMUNOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER Y
ENFERMEDAD METABÓLICA RELACIONADOS CON LA RUTA DE
RESPUESTA A HIPOXIA**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biomedicina por

Carla Jiménez Jiménez

Directores

Marco Antonio Calzado Canale

Eduardo Muñoz Blanco

Córdoba, Septiembre de 2018

TITULO: *IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER Y ENFERMEDAD METABÓLICA RELACIONADOS CON LA RUTA DE RESPUESTA A HIPOXIA*

AUTOR: *Carla Jiménez Jiménez*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Identificación de marcadores predictivos en cáncer y enfermedad metabólica relacionados con la ruta de respuesta a hipoxia.

DOCTORANDO/A: Carla Jiménez Jiménez

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

El documento presentado por la doctoranda Carla Jiménez Jiménez, con título “Identificación de marcadores predictivos en cáncer y enfermedad metabólica relacionados con la ruta de respuesta a hipoxia”, corresponde a su trabajo de tesis doctoral realizado en el periodo comprendido entre Enero de 2015 y Julio de 2018. En este trabajo se han cumplido los objetivos establecidos al comienzo del proyecto, haciendo posible el aprendizaje de técnicas experimentales de gran relevancia y utilidad en el campo de la investigación en biología molecular. Este trabajo ha permitido la obtención de resultados acerca de la expresión de proteínas clave implicadas en la respuesta a hipoxia en precursores de células pancreáticas durante la diferenciación celular y en muestras de carcinoma de pulmón humano. Además, ha permitido el análisis del perfil metabolómico, con especial interés en endolípidos con capacidad hipoximimética, en muestras de pacientes con carcinoma de pulmón. Igualmente, se ha estudiado el papel de endolípidos con capacidad hipoximimética en la diferenciación de las células beta pancreáticas, así como su papel sobre la enfermedad vascular periférica asociada a la diabetes tipo 2. La finalidad del estudio ha sido compensada con la publicación de dos artículos científicos en revistas indexadas dentro del primer cuartil de su área. De manera conjunta a la elaboración de este proyecto, se han realizado trabajos en apoyo a otros miembros del grupo los cuales también han contribuido al avance y finalización de este trabajo dando lugar a otras publicaciones. Además, se ha dado difusión a los resultados obtenidos de todos los trabajos mediante la presentación de estos a jornadas y congresos siendo expuestos a través mediante comunicaciones orales.

PUBLICACIONES Y TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL

- Publicaciones derivadas de la tesis doctoral.

Paula Moreno*, Carla Jiménez-Jiménez*, Martín Garrido-Rodríguez, Mónica Calderón-Santiago, Susana Molina, Maribel Lara-Chica, Feliciano Priego-Capote, Ángel Salvatierra, Eduardo Muñoz and Marco A. Calzado. Metabolomic profiling of human lung tumor tissues: nucleotide metabolism as a candidate for therapeutic interventions and biomarkers. MOLECULAR ONCOLOGY. 2018 AUG 12. DOI: 10.1002/1878-0261.12369. Factor de impacto: 5.264. Área temática: Oncología. Posición de la revista: 46 de 222 (Primer cuartil, **Q1**).

***Co-autores.**

Carla Jiménez-Jiménez, Maribel Lara-Chica, Belén Palomares, Juan Antonio Collado, J. Lopez-Miranda, Eduardo Muñoz, Marco A. Calzado. Effect of *N*-acyl-dopamines on beta cell differentiation and wound healing in diabetic mice. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - MOLECULAR CELL RESEARCH. 2018, 1865(11): 1539-1551. Factor de impacto: 4.651. Área temática: Bioquímica y Biología molecular. Posición de la revista: 55 de 292 (Primer cuartil, **Q1**).

- Publicaciones en colaboración durante el desarrollo de la tesis doctoral.

García-Limones, C., Lara-Chica, M., Jiménez-Jiménez, C., Perez, M., Moreno, P., Muñoz, E., Calzado, M.A. CHK2 stability is regulated by the E3 ubiquitin ligase SIAH2. ONCOGENE. 2016, 35 - 33, pp. 4289 - 4301. Factor de impacto: 7.932. Área temática: Posición de la revista: 15 de 213 (Primer decil, **D1**).

Navarrete C, Carrillo-Salinas F, Palomares B, Mecha M, Jiménez-Jiménez C, Mestre L, Feliú A, Bellido ML, Fiebich BL, Appendino G, Calzado MA, Guaza C, Muñoz E. Hypoxia mimetic activity of VCE-004.8, a cannabidiol quinone derivative: implications for multiple sclerosis therapy. J NEUROINFLAMMATION. 2018 1; 15(1):64. Factor de impacto: 5.193. Área temática: Inmunología. Posición de la revista: 33 de 155 (Primer cuartil, **Q1**).

Belén Palomares, Francisco Ruiz Pino, Carmen Navarrete, Inmaculada Velasco, Miguel A. Sánchez Garrido, Carla Jiménez-Jiménez, Carolina Pavicic, María J. Vazquez, Giovanni Appendino, M. Luz Bellido, Marco A. Calzado, Manuel Tena-Sempere, Eduardo Muñoz. VCE-004.8, A multitarget cannabinoquinone, attenuates adipogenesis and prevents diet-induced obesity. SCIENTIFIC REPORTS. Factor de

impacto: 4.122. Área temática: Ciencias multidisciplinares. Posición de la revista: 12 de 64 (Primer cuartil, **Q1**). En revisión.

- **Comunicaciones presentadas a congresos internacionales.**

Jiménez Jiménez C, Rangel Zuñiga O, Lara Chica M, Morrugares R, Muñoz E, López Miranda J, Calzado M. "Correlation between polymorphisms related to the hipoxia pathway and type 2 diabetes mellitus". 22nd International Conference on Prevention of Diabetes and Complications. Londres, Reino Unido, 12-13 de Octubre de 2017.

- **Comunicaciones presentadas a jornadas.**

Carla Jiménez-Jiménez, Maribel Lara-Chica, Rosario Morrugares, Eduardo Muñoz, Marco A. Calzado. "Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Metabolic Disease". VIII Jornadas de Jóvenes investigadores, Córdoba, España, 30-31 de Mayo de 2017.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 12 de Septiembre de 2018
Firma del/de los director/es



Fdo.: Marco A. Calzado Canale



Fdo.: Eduardo Muñoz Blanco

“La humanidad también necesita soñadores,
para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que
les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio”

MAIRE CURIE

Agradecimientos

Es el momento de agradecer a todas las personas que han estado presentes y que han contribuido tanto profesional como personalmente a que esta tesis haya visto la luz.

En primer lugar quería darles las gracias a mis directores de tesis, Marco y Eduardo, principalmente por haber cumplido mi sueño de poder realizar una tesis doctoral en un gran grupo como es el de “Inflamación y Cáncer” y haberme enseñado todos los conocimientos adquiridos a lo largo de estos 4 años. Muchas gracias por todo lo que me habéis enseñado tanto a nivel científico como personalmente. Eduardo, muchas gracias por estar luchando constantemente para obtener proyectos y financiación para poder darnos una inmejorable calidad científica. Agradecerle también a Rosario que siempre haya estado tan pendiente de llevar las facturas al día y siempre con una sonrisa y tan amable. Marco, muchas gracias por depositar una confianza en mí desde el primer momento y porque además de actuar como director de tesis en ocasiones actuar como algo más que un simple jefe. Agradecerle también a Carmen que siempre haya estado dispuesta a revisar el inglés de cada artículo.

También quería acordarme de mis compañeros por la ayuda prestada en todos los momentos tanto gratificantes como de angustia y desesperación. Gracias por estar siempre ahí cuando lo he necesitado, por enseñarme y ayudarme a que esta tesis haya visto su fin. Habéis sido un pilar muy importante en esta etapa de mi vida. Carmen N, gracias por haberme enseñado tan bien, aclararme siempre todas y cada una de las dudas que me han ido surgiendo, por nuestras charlas tan divertidas y filosóficas en el pasillo y en el café, los viajes y los buenos momentos que vamos a seguir viviendo. Estoy segura de que vamos a seguir sumando grandes momentos juntas. JA, gracias por ser el oso amoroso y todos los buenos momentos que hemos vivido, eso sí, entre risas siempre. Por escucharme y por darme tu opinión siempre. Al final he llegado a la conclusión de que somos más parecidos de lo que pensaba. Eres una gran persona. Adela, nos conocemos de poquito tiempo pero me alegra haberte conocido y gracias por aportarme tu ayuda y tus conocimientos cuando lo he necesitado. Maru, también nos conocemos desde hace poco tiempo pero posiblemente seas de las personas con las que más me he reído en el laboratorio en esta última etapa. Álex, gracias también a ti, por todos los buenos momentos y las “cositas personales” que nosotros sabemos que me has enseñado. El momento cafetería no se me olvidará nunca. Rosario, aunque al principio es cierto que hablábamos poco y aun siendo tan diferentes hemos terminado sabiendo trabajar juntas, además de pasar momentos muy divertidos. Gracias por todo. También agradecerle a mis compis del GC11, en especial, a ti, a mi amiga Mari Carmen

Navarro, muchas gracias por estar siempre ahí en todo momento y darme un abrazo cuando me ha hecho falta. Mucha suerte y mucho ánimo con el fin de la tesis que todo llega. Aquí tendrás una amiga siempre que lo necesites y espero seguir en contacto contigo. Vas a ser la mejor profesora que cualquier alumno quisiera tener.

Paula, muchas gracias por estar presente en la primera etapa de mi tesis. Me has ayudado muchísimo ya que llegué con mucha inexperiencia y me demostraste que eres una gran persona y que hay que ser paciente para obtener los resultados deseados. Mis charlas contigo las recordaré siempre.

Martín, mi bioinformático favorito. ¡Qué iba a hacer sin ti! Te conocí cuando viniste a hacer el TFM y enseguida te cogí mucha estima y he pasado grandes momentos contigo. Siempre tendremos un pequeño secreto. Muchísimas gracias por todo lo que has aportado para que esta tesis haya salido adelante. Sin ti la parte de Metabólica hubiera sido mucho más dura de lo que ha sido.

Ana, muchísimas gracias por todos los momentos que hemos vivido juntas. Es cierto que no nos conocemos desde hace mucho tiempo pero eres una persona 10 y con la que he cogido confianza muy rápido. Me alegra que hayas compartido mi última etapa y haber tenido el placer de conocerte. Gracias por todo lo que me has animado en esta etapa que posiblemente haya sido la más dura en todos los aspectos. Siempre serás mi compi de bus y del Carnaval. Espero que no perdamos el contacto nunca y sigamos pasándolo tan bien como hasta día de hoy. Te deseo lo mejor tanto profesional como personalmente.

Víctor y Estrella, mis madrileños favoritos. Gracias por todo. Me habéis aportado más de lo que creéis. Habéis estado ahí cuando he necesitado hablar de algún tema o algún consejo, siempre me habéis escuchado en todo momento. Mil gracias. Vitis, mi compañero de bromas, sabemos seguirnos las bromas hasta el final. Y eso no suele pasar frecuentemente. Posiblemente con otra de las personas que he pasado mis mejores momentos en este laboratorio. Estrella, mi compañera de tareas, siempre predestinadas a hacer las tareas juntas. Desde luego, no he podido tener mejor compañera a lo largo de todo este tiempo. Me encanta como eres, siempre sabes aportar el grado de paz que uno necesita para tranquilizarse. Muchísima suerte con la tesis que puedes con eso y más. En definitiva, aquí tenéis una amiga para lo que necesitéis y aunque esta etapa se termina espero no perder el contacto y seguir presente en cada uno de vuestros logros porque sé que van a ser muchos.

Susana, mi niña bonita. Qué buenos momentos y que risas nos hemos echado. La primera TFM que pasó cuando entré pero la que más huella ha dejado en mí. Gracias por ese año que vivimos juntas porque fue muy bueno, por ser así, porque me has regalado momentos maravillosos y porque aun habiendo empezado otra etapa seguimos en contacto y seguimos viéndonos.

Belén, mi compañera de viaje. Empezamos juntas y enseguida conectamos. Es lo que tiene ser acuario y celebrar los cumpleaños juntas. Muchas gracias por todo lo que me has aportado. Eres una gran persona, siempre con una sonrisa y buena cara. Posiblemente eres de las personas con las que más tiempo he pasado tanto a nivel científico como personal, podría decir que eres la que más me conoces como soy en todos los sentidos. Nunca olvidaré la carta de cumpleaños que me escribiste, los puntos de sutura a nuestros ratones, los viajes, nuestras salidas, las charlas del café y todo lo que me has aportado durante este tiempo. Y porque sé que aunque se acabe esta etapa juntas, el contacto no se va a perder y seguiremos viéndonos y pasando grandes momentos juntas. Eres una gran amiga.

Carmen R, siempre serás mi sevillana favorita. Gracias por todo. Posiblemente de las personas más sinceras con las que me he topado. Me encanta que cuando tienes que decir algo tanto bueno como malo lo dices sin más te siente bien o mal y eso es de agradecer porque yo soy igual y me gusta la gente así. Al principio es cierto que a lo mejor no hablábamos mucho pero al final te has convertido en una de mis mejores amigas. Se me ha hecho complicado este año no verte por el lab y no ver esa sonrisa a diario. Me encantas como eres, tus audios y la gracia que tienes para decir las cosas. Siempre recordaré momento Bilindo y las dos canciones que estaban sonando. Nuestro concierto y los momentos inolvidables que hemos vivido por Córdoba y Sevilla. Pronto tocará vivirlos en otros lugares.

Irene, la verdad es que no sé por dónde empezar para agradecerte todo lo que me has aportado y hecho por mí en todos y cada uno de los sentidos. Gracias por todo lo que hemos vivido juntas y los momentos que quedan aún por vivir. Gracias por haber sido una maestra ejemplar, nadie me pudo enseñar mejor a dar puntos de sutura pero indiscutiblemente gracias por ser mi amiga, estar siempre ahí en todos y cada uno de mis momentos tantos buenos como malos, por tenderme una mano cuando lo he precisado, por darme tu hombro cuando he necesitado desahogarme, por calmarme, hacer que me relajara, pensara las cosas antes de actuar y por supuesto por todos y cada uno de los consejos que me has dado. Contigo solo podré tener gratitud eternamente. Gracias por acogerme siempre en esa familia tan maravillosa que tienes junto a Raúl, Álex y Ari y espero seguir teniendo ese contacto con vosotros y ver

constantemente como vais creciendo tanto personal como profesionalmente. Os quiero familia.

Maribel, te quería dejar para el final porque no tengo como agradecerte todo lo que has hecho por mí durante todo este tiempo. No pude tener mejor persona que me enseñara el funcionamiento del laboratorio y todas las técnicas que se desempeñaban en él. Mi compañera de Western y fosforilaciones, mi amiga, mi confidente y eso nadie lo podrá cambiar. Ha sido un placer trabajar junto a ti todo este tiempo. Desde luego mejor compañera es/será difícil tener. Ha sido un placer haber trabajado contigo porque incluso siendo tan diferentes desde el minuto uno nos compenetramos y personalmente me ha sido muy fácil trabajar contigo hasta el grado de mirarnos y saber que pensamos. Nuestras confesiones en el cuarto oscuro siempre estarán ahí y no las olvidaré nunca. Como te dije en su momento, lo que unió el GC-04 no lo romperá nadie. Este último año, te he echado muchísimo de menos y se me ha hecho complicado mirar a la izquierda y que no estuvieras ahí. Por suerte aunque estemos separadas seguimos en contacto y me alegra muchísimo ver todo lo que estás logrando y que estás cumpliendo tu sueño. Espero que algún día nuestros caminos se vuelvan a cruzar profesionalmente porque desde luego personalmente ya lo están. Pronto nos vemos por otros lugares las 3 Marías para que la florecilla de Mayo esté completa porque ahora mismo sin vosotras estoy incompleta. Ya sabéis mi cuartito lo quiero. Te quiero mucho amiga.

También quería mencionar y agradecer a todos mis antiguos compañeros y jefe del grupo de "Nuevas Terapias en cáncer". En particular, quería mencionar a Laura y Vanessa que además de ser compañeras se han convertido en mis amigas. Gracias por todo chicas os quiero mucho.

A parte del ámbito laboral también he contado con personas muy importantes en mi vida de las cuales no me quiero olvidar y que me han hecho que hoy en día sea como soy.

Sole y Silvia, mis niñas. Gracias por formar parte de mi vida esta última etapa de mi tesis, habéis sido un gran apoyo este tiempo y me habéis ayudado muchísimo a seguir adelante y no tirar la toalla. Gracias por haberme parado los pies en ocasiones y no dejar que cometiera alguna locura de la que luego tuviera que arrepentirme. Mis compañeras de batallitas, mis mejores amigas. Sois muy importantes en mi vida y espero seguir unida a vosotras hoy y siempre. Quiero ir creciendo junto a vosotras para siempre. Os quiero hermanas.

Mi Miguel, no sé cómo expresar todo lo que siento por ti. Mi mejor amigo, mi hermano, la persona que mejor me conoce y que lo sabe absolutamente de mí. La persona que hasta por Whatsapp sabe cómo me siento y qué pienso. Quién me iba a decir a mí que esa persona que conocí hace 12 años con la que me senté en la fuente del Bulevar y empezó a contarme que estaba ocurriendo en su vida, iba a convertirse en una de las personas más importantes de mi vida. La persona que aun estudiando una cosa totalmente diferente a lo mío, nos ayudábamos a buscar información y hacer los trabajos del uno y del otro. Nuestras charlas por Messenger todos los días y si algún día no nos conectábamos ya estábamos diciendo algo pasa. Gracias por estar en todos y cada uno de mis logros y fracasos porque las cosas se llevan mejor con gente como tú al lado. Gracias por arroparme siempre y sentir tu apoyo en todo momento y aún más en esta última etapa que tan complicada y tan cuesta arriba se me ha hecho. Siempre te he sentido tan cerca de mí que incluso en alguna etapa que hemos estado en lugares diferentes hemos seguido tan unidos como si estuviéramos en la misma ciudad. Sé que ahora mismo estás pasando por una etapa complicada pero tranquilo todo llega y a ti te va a llegar porque las buenas personas merecen una vida maravillosa y seré la primera en estar ahí para ver como eso ocurre porque pase lo que pase siempre serás mi mitad y eso nadie lo podrá cambiar.

Tomás, mi compañero de profesión. Siempre de la mano en todo momento, en la carrera, en el máster y aunque en el doctorado nos separamos, gracias por hacerme tan partícipe en todo momento de tus logros y de las muchas cosas buenas que están aún por venir. Te quiero mucho y gracias por ser mi amigo y preocuparte por mí siempre. Gracias también a mi conserje favorita Ana por llegar y recibirme siempre con esa sonrisa tan linda que tienes y por convertirte en una gran amiga, gracias por todos los momentos que hemos vivido juntas y los muchos que quedan.

Agradecerle también a mi tridente: Álex, Antonio y Alberto. Mis tres A, gracias por ser como sois y estar presente en la última etapa de mi tesis. Os habéis convertido en más que amigos, muchas gracias por todo lo que me estáis enseñando y estoy aprendiendo de vosotros. Me habéis enseñado como en poco tiempo alguien puede pasar a ser alguien tan importante y tan básico en tu vida. Me encanta nuestro grupo, nuestras salidas, nuestras conversaciones, nuestras ferias y todos los 1001 momentos que aún nos quedan por vivir juntos. Espero seguir creciendo como persona junto a vosotros y estar presente en todos y cada uno de vuestras vidas y de las cosas maravillosas que os quedan por vivir porque gente como vosotros se merece una vida llena de felicidad. Os quiero mis chicos.

Por supuesto agradeceré a todos y cada uno de los miembros de mi familia, abuela, tíos, primos y sobrina. No he podido tener más suerte de haber nacido en esta familia. Gracias por todo lo que habéis hecho por mí. A mis tres estrellas que aunque sé que no podrán estar este día estarán más que presentes viendo como la defiendo, os quiero mucho y siempre estaréis en mi corazón. A mis abuelos, Rafael y José, gracias por todos y cada uno de los momentos que he vivido con vosotros porque los tengo bien guardados en mi recuerdo. Gracias por darme una infancia, adolescencia y adultez tan feliz.

Abuela Emilia, va a ser difícil que llegue el día de la defensa y no verte. Has estado en todos cada uno de los momentos más importantes de mi vida y va a ser el primero en el que no estés. Te fuiste sin avisar y has dejado un vacío muy grande en todos y cada uno de nosotros. Estos dos años sin ti se han hecho complicados. Se echa de menos no hablar contigo, no verte, no reírme contigo, no pasar buenos ratos contigo. En definitiva, muchas gracias por todo lo que me has enseñado a lo largo de mi vida e indiscutiblemente por ser la mejor abuela que uno podría tener, siempre tan pendiente de todos, por no perder el contacto nunca y porque sé que estés donde estés me cuidas y no me soltarás nunca. Siempre serás mi estrella y te quiero muchísimo. Si algo he aprendido de lo que pasó es “Vive el día a día como si fuera el último”. Te quiero demasiado y sé que estés donde estés me estas cuidando, guiando y ayudando a tomar la decisión correcta en cada momento.

Por último, no podía ser de otra forma, cerrar mis agradecimientos con mis padres. Las dos personas más importantes de mi vida, las personas que me han dado todo. Si debo de agradecerle algo a alguien es a ellos, por estar siempre conmigo, por apoyarme, por felicitarme cuando lo han tenido que hacer y por reírme cuando algo no he hecho bien. Si hoy he llegado a este punto es gracias a vosotros por darme una educación y unos valores que mucha gente en el mundo desearía tener. Parte de esta tesis es vuestra y si ha visto la luz es gracia a vosotros indiscutiblemente. Gracias por estar junto a mí en todo momento y no haberme dejado sola nunca, por aconsejarme siempre tan bien, por darme un abrazo cuando lo he necesitado y por darme la mejor infancia, familia y vida que podría tener. Muchísimas gracias por todo lo que habéis hecho y seguís haciendo por mí. Espero seguir sumando miles de momentos junto a vosotros y seguir tan unidos esté donde esté. Os quiero demasiado y siempre estaré ahí para cuando me necesitéis.

Esta tesis va dedicada a los tres pilares más importantes de mi vida: Mamá, Papá y abuela Emilia.

Índice

I. RESUMEN Y ABSTRACT	3
1. Resumen	3
2. Abstract	6
II. ABREVIATURAS	11
III. INTRODUCCIÓN	17
1. Hipoxia	17
1.1 Homeostasis del oxígeno	17
1.2 Estructura de HIF	17
1.3 Regulación de HIF	19
1.4 Implicaciones de HIF-1 α en patologías	23
1.4.1 Implicaciones biológicas de HIF	23
1.4.2 Implicaciones fisiopatológicas de HIF	26
2. Respuesta a hipoxia en síndrome metabólico y diabetes	27
2.1 HIF-1 α , síndrome metabólico y diabetes	27
2.2 HIF-1 α y función de las células beta	28
2.3 Efecto de las <i>N</i> -acil dopaminas sobre HIF-1 α	31
3. Metabolómica	32
3.1 Generalidades	32
3.2 Métodos y técnicas en un análisis metabolómico	34
3.3 Metabolómica en cáncer	35
3.4 Metabolómica en cáncer de pulmón	37
3.5 Hipoxia en el metabolismo tumoral	39
IV. OBJETIVOS	44
V. MATERIALES Y MÉTODOS	48
1. Líneas celulares y reactivos	48
2. Western Blot y anticuerpos	48
3. Inmunoprecipitación	49
4. Extracción de ARN y qRT-PCR	49
5. Ensayo de insulina en suero	51
6. Ensayo de angiogénesis <i>in vitro</i>	51
7. Animales	52
8. Modelo de cicatrización de heridas	52
9. Análisis de heridas	52

10. Histología e inmunohistoquímica	52
11. Análisis de células progenitoras endoteliales (EPCs)	54
12. Cohorte de pacientes	54
13. Análisis metabólico. Preparación de la muestra	55
14. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución/espectroscopia de masas (UPLC/MS/MS)	55
15. Cromatografía de gases / espectroscopia de masas (GC/MS)	56
16. Garantía de calidad / Control de calidad	56
17. Extracción de datos e identificación de compuestos	56
18. Análisis y estadística de datos	57
19. Análisis de datos públicos de estudios de genómica del cáncer	58
VI. RESULTADOS	63
1. Efecto de la actividad hipoximimética de las <i>N</i> -acil dopaminas sobre la diferenciación de células beta y la cicatrización de heridas en ratones diabéticos	63
1.1 Caracterización de la vía de respuesta a hipoxia en la diferenciación celular de las células pancreáticas AR42J con activina A y HGF	63
1.2 <i>N</i> -acil dopaminas estabilizan HIF-1 α en células AR42J durante la diferenciación a células beta	65
1.3 <i>N</i> -acil dopaminas estabilizan HIF-1 α en células pancreáticas humanas (hNPCs) durante la diferenciación a células beta	69
1.4 STEARDA y PALDA estabilizan HIF-2 α y promueven la angiogénesis <i>in vitro</i>	73
1.5 Efecto de cierre de la herida con <i>N</i> -acil dopaminas en ratones diabéticos tipo 2	75
1.6 La estabilización de la vía de respuesta a hipoxia activa varios procesos implicados en la curación de heridas	78
2. Perfil metabólico de tejido tumoral de cáncer de pulmón humano: metabolismo de nucleótidos como candidato para intervenciones terapéuticas y biomarcadores	81
2.1 Perfil metabólico de los tejidos pulmonares	81
2.2 Metabolismo de la glucosa en el cáncer de pulmón	84
2.3 Niveles de glutatión y otros marcadores de estrés oxidativo	86

2.4 Metabolismo de arginina y poliaminas.....	87
2.5 Metabolismo de ácidos grasos y mediadores lipídicos.....	87
2.6 Metabolismo del carbono	89
2.7 Catabolismo de nucleótidos	90
2.8 Análisis del perfil de expresión génica en el metabolismo de las purinas. Expresión histológica de ATIC y ADSL	91
VII. DISCUSIÓN	102
1. Efecto de la actividad hipoximimética de las <i>N</i> -acil dopaminas sobre la diferenciación de células beta y la cicatrización de heridas en ratones diabéticos	102
2. Perfil metabólico de tejido tumoral de cáncer de pulmón humano: metabolismo de nucleótidos como candidato para intervenciones terapéuticas y biomarcadores.....	106
VIII. CONCLUSIONES.....	115
IX. BIBLIOGRAFÍA	120
X. ANEXOS	144

Resumen y Abstract

I. RESUMEN Y ABSTRACT

1. RESUMEN

La búsqueda de nuevos marcadores predictivos en enfermedades de alta prevalencia como el cáncer o el síndrome metabólico sigue siendo a día de hoy uno de los pilares básicos en la investigación biomédica traslacional. En este sentido, la ruta de respuesta a hipoxia se ha presentado en la última década de especial interés por su relevancia en el control de multitud de procesos. La supervivencia de los organismos multicelulares depende de la buena homeostasis de oxígeno, donde el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) es la proteína clave para regular esta vía. Existe una estrecha relación entre la carcinogénesis y el control de la homeostasis del oxígeno. Del mismo modo, investigaciones en los últimos años han demostrado el papel del factor HIF-1 α en el control de las etapas más relevantes del desarrollo de la Diabetes mellitus tipo 2 y por tanto en el desarrollo del síndrome metabólico, como son la disfunción de las células beta, resistencia a la insulina, disfunción del adipocito y la inflamación. Estos datos han provocado un interés potencial en el análisis de la ruta de HIF-1 α para la búsqueda de marcadores predictivos en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y complicaciones relacionadas, así como en su papel en la carcinogénesis.

Se ha descrito que las *N*-acil-dopaminas son endolípidos con propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Previamente mostramos la capacidad de estos compuestos para inducir la estabilización de HIF-1 α . La hipoxia y HIF-1 α juegan un papel importante en las etapas más relevantes de la patogénesis diabética. Por ello, nuestros resultados muestran cómo la vía de respuesta a hipoxia se altera durante la diferenciación de las células beta, acompañada de una inducción del factor de transcripción HIF-1 α . Demostramos cómo algunas *N*-acil-dopaminas inducen la diferenciación de células beta y la producción de insulina en dos modelos celulares diferentes. En paralelo, estos endolípidos promueven la angiogénesis *in vitro* y el cierre de heridas en ratones diabéticos tipo 2. Por lo tanto, el uso potencial de la modulación farmacológica de las *N*-acil-dopaminas puede tener implicaciones para las estrategias de prevención y tratamiento de la diabetes.

Por otro lado, aunque la metabolómica ha tenido un considerable interés en el campo de la detección y el tratamiento del cáncer de pulmón, solo un número muy

limitado de trabajos lo han aplicado a los tejidos. Nuestros resultados proporcionan un análisis exhaustivo de los perfiles metabólicos y las alteraciones bioquímicas de un número relevante de tejidos de cáncer de pulmón, incluidos los subtipos histológicos más importantes (adenocarcinoma y carcinoma escamoso de pulmón). Proporcionan un análisis detallado de los cambios metabólicos que tienen lugar en las rutas bioquímicas más relevantes de los subtipos histológicos más importantes en cáncer de pulmón. Mostramos cambios relevantes en el metabolismo de los nucleótidos, con un número importante de metabolitos con altos valores de capacidad predictiva, los cuales podrían ser usados como biomarcadores o potenciales dianas terapéuticas.

2. ABSTRACT

The search for new predictive biomarkers in major diseases, including cancer or metabolic syndrome, today it remains one of the basic pillars of translational biomedical research. In this sense, the hypoxia response pathway is especially interesting during because its relevance in control of a multitude of processes. The survival of multicellular organisms depends on good oxygen homeostasis, where the hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) is the key protein required to regulate this pathway. There is a close relationship between carcinogenesis and control of oxygen homeostasis. Similarly, research in recent years has demonstrated the role of the HIF-1 α factor in control of the most relevant stages of type 2 diabetes mellitus an metabolic syndrome development, such as beta cell dysfunction, insulin resistance, adipocyte dysfunction and inflammation. These data have led to a potential interest in the analysis of the HIF-1 α pathway for the search of predictive markers in the treatment of type 2 diabetes and related complications, as well as its role in carcinogenesis.

It has been described that *N*-acyl-dopamines are endolipids with neuroprotective, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Previously, We showed the ability of these compounds to induce HIF-1 α stabilization. Hypoxia and HIF-1 α play an important role in the most relevant stages of diabetic pathogenesis. Therefore, our results show how the hypoxia response pathway is altered during beta cells differentiation, accompanied by an induction of the transcription factor HIF-1 α . We demonstrate how some *N*-acyl-dopamines induce beta-cell differentiation and insulin production in two different cell models. In parallel, these endolipids promote angiogenesis *in vitro* and wound closure in type 2 diabetic mice. Therefore, the potential use of pharmacological modulation of *N*-acyl-dopamines may have implications for diabetes prevention and treatment strategies.

On the other hand, although metabolomics has enjoyed a considerable interest in the field of lung cancer detection and management, only a very limited number of works have applied it to tissues. Our results provide a thorough analysis of metabolic profiles of a relevant number of lung cancer tissues, including the most important histological subtypes (adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma). They provide a detailed analysis of the metabolic changes taking place in relevant biochemical pathways of the most important histological subtypes of lung cancer. We

show significant changes in the nucleotide metabolism of nucleotides, with a important number of metabolites with high predictive capability values , which could be used as biomarkers and also to identify novel targets.

Abreviaturas

II. ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
AC	Adenocarcinoma
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADSL	Adenosuccinato liasa
AEA	<i>N</i> -araquidonil-etanolamida
AFP	Alfa-fetoproteína
AMP	Adenosina 5-Monofosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST	Aril sulfotransferasa
ATIC	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa/IMP ciclohidrolasa
ATP	Adenosina trifosfato
BHBA	3-Hidroxibutirato
BSTFA	Bistrimetil-silil-trifluoroacetamida
CMP	Citidina monofosfato
COL1A2	Colágeno humano de tipo I alfa 2
COMT	Catecol-O-metil transferasa
DFO	Deferoxamina
DFX	<i>Mesilato de deferoxamina</i>
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
DSQ	Cuadrupolo de barrido rápido
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPCs	Células progenitoras endoteliales
ESI	Ionización por electrospray
FAAH	Hidrolasa amida de ácidos grasos
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLK-1	Receptor del dominio de inserción de la quinasa
FMN	Flavín mononucleótido
GC	Cromatografía de gases
GGT	gamma-glutamyl transpeptidasa
GMP	Monofosfato de guanosina

GMPR	Guanosina monofosfato reductasa
GPC	Glicerolfosfolina
G3P	Glicerol 3-fosfato
GSH	Glutación, reducido
GSSG	Glutación, oxidado
GT	Tejido de granulación
HIF	Factor inducible por hipoxia
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos humano
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana
H&E	Hematoxilina y eosina
IMP	Inosina 5-Monofosfato
(IRS2)-AKT	Sustrato del receptor de insulina
KRBB	Tampón bicarbonato de Krebs-Ringer
LC	Cromatografía líquida
LIT	Trampa iónica lineal
LTQ	Cuadrupolo de Trampa Lineal
MetO	Metionina sulfóxido
MS	Espectrometría de masas
MTA	5-Metiltioadenosina
NADA	<i>N</i> -araquidonoil dopamina
NADs	<i>N</i> -acil dopaminas
NEUROD	<i>Factor de diferenciación neurogénico</i>
NGN3	Factor de transcripción <i>neurogenina 3</i>
NHDF	Fibroblastos dérmicos humanos normales
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
OCT	Temperatura óptima de corte
ODC	Ornitina descarboxilasa
OLDA	<i>N</i> -oleoil dopamina
PALDA	<i>N</i> -palmitoil dopamina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDX1	<i>Proteína homeobox pancreática y duodenal 1</i>
PHD	Dioxigenasa de dominio prolil hidroxilasa
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
QA	Garantía de calidad

QC Control de calidad
RBCs Glóbulos rojos
SAH S-adenosilhomocisteína
SCA-1 *Antígeno 1 de las células madre*
SCC Carcinoma de células escamosas
SDF-1 *Factor derivado de células estromales 1*
SIAH2 Seven in absentia homolog-2
SSPA Sistema Sanitario Público de Andalucía
STEARDA N-estearoil dopamina
TCA Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
THF 5-metil-tetrahidrofolato
TM Tricrómico de Masson
T2D Diabetes mellitus tipo 2
UPLC Cromatografía líquida de ultra-alta resolución
VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular
XMP Xantosina 5'-monofosfato

Introducción

III. INTRODUCCIÓN

1. Hipoxia

1.1 Homeostasis del oxígeno

Cuando existe una disminución de oxígeno (hipoxia), los organismos tienden a alterar las actividades fisiológicas fundamentales, como la respiración y el metabolismo, para mantener la homeostasis. Si no existe una respuesta adecuada a la hipoxia, los sistemas múltiples podrían desregularse, lo que podría llevar a la muerte celular. En el caso de los seres humanos, la respuesta de hipoxia puede incluir respuestas fisiológicas que van desde la respiración, metabolismo alterado, la producción de células sanguíneas y la neovascularización (Lahiri *et al*, 2006).

Por ello, los organismos aeróbicos necesitan la presencia de oxígeno (O₂) para producir las cantidades necesarias de ATP y poder realizar las actividades metabólicas. Debido a esto, la privación de O₂ genera un estrés significativo en las células. La acumulación inapropiada de radicales libres se encuentra vinculada con la privación de O₂, causando estrés en el ADN y proteínas de la célula. Cuando existe hipoxia, las células activan una serie de respuestas adaptativas para que ajuste el suministro de O₂ con las demandas metabólicas, bioenergéticas y redox. Este cambio en los niveles de oxígeno conlleva a la activación o represión de ciertos genes reguladores homeostáticos permitiendo la supervivencia de tejidos y células. Estos sucesos son llevados a cabo por diferentes vías, como la respuesta de proteínas desplegadas, la señalización de mTOR y la regulación de genes por factores inducibles por hipoxia (HIF). Dentro de esto, HIF se reconoce como un modulador clave de la respuesta transcripcional al estrés hipóxico (Majmundar *et al*, 2010).

1.2 Estructura de HIF

Los factores de transcripción de la familia HIF están formados por un heterodímero que consta de dos subunidades, α y β (Bardos & Ashcroft, 2005) (Semenza, 2007). A día de hoy, existen tres isoformas conocidas de HIF- α : HIF1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . La subunidad β también es conocida como el translocador nuclear del receptor de aril hidrocarburos (ARNT). Sin embargo, mientras que la subunidad α es la que está altamente regulada por el nivel de oxígeno, HIF-1 β presenta una expresión más constitutiva (Bardos & Ashcroft, 2005; Rocha, 2007). Cada subunidad de HIF- α

comparte regiones de dominio muy similares, ya que presentan un motivo de tipo hélice básica-bucle-hélice (bHLH) y el dominio PER-ARNT-SIM (PAS). HIF-1 α y HIF-2 α contienen dos dominios de transactivación, mientras que HIF-3 α carece del dominio de transactivación C-terminal y, se piensa que actúa como un inhibidor de HIF-1 α y HIF-2 α (Bardos & Ashcroft, 2005). HIF-1 α se expresa en todas las células, mientras que HIF-2 α y HIF-3 α se expresan en algunos tejidos, como son células endoteliales vasculares, neumocitos tipo II, células intersticiales renales, células parenquimatosas hepáticas y células del linaje mieloide (Bertout *et al*, 2008).

El extremo N-terminal de HIF-1 α contiene los dominios bHLH y PAS necesarios para la dimerización y la unión al ADN (Wang *et al*, 1995b). El extremo C-terminal contiene los dominios necesarios para realizar la degradación y la transactivación, como son el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD), aportando inestabilidad dependiente de oxígeno, dos dominios de transactivación independientes (N-TAD y C-TAD) y un dominio inhibidor (ID) que regula negativamente los dominios de transactivación (Jiang *et al*, 1996). Mientras que el extremo N-terminal de TAD (N-TAD) también contribuye a la degradación, el extremo C-terminal de TAD (C-TAD) funciona cuando es inducido por hipoxia. El C-TAD interactúa con un coactivador como p300 / CBP, el cual es independiente de la estabilidad de la proteína y se requiere para la actividad HIF (Ruas *et al*, 2002). Centrándonos en nuestro estudio y en estudios previos, las isoformas HIF-1 α y HIF-2 α son las de mayor interés.

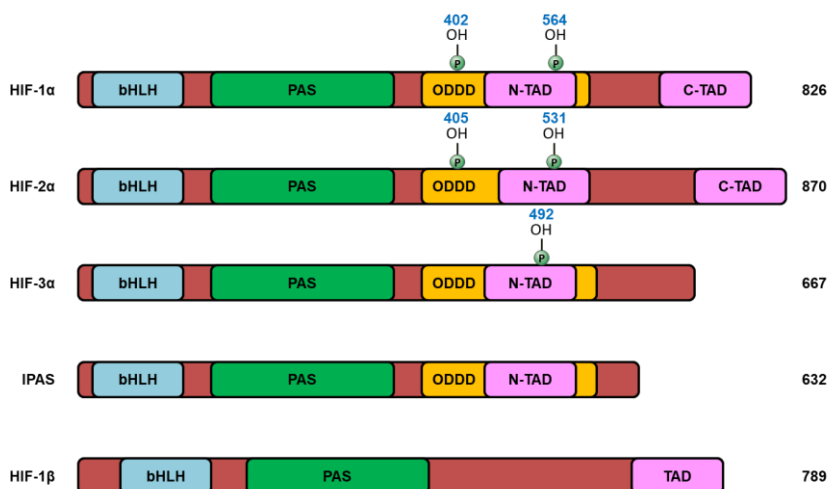


Figura 1. Estructura del dominio de las proteínas HIF en humanos. Esquema que muestra los dominios estructurales de los miembros de la familia HIF: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α y HIF-1 β . CTAD, dominio de transactivación C-terminal; NTAD, dominio de transactivación N-terminal; Dominio PAS, Per/ ARNT/ Sim; PAC, dominio C-terminal asociado a PAS. El número total de aminoácidos de cada subunidad se muestra al final de la estructura del dominio.

1.3 Regulación de HIF

El descubrimiento de HIF condujo a la búsqueda de los mecanismos moleculares implicados en la detección celular de la hipoxia. Así fue como se identificaron las principales proteínas implicadas en la regulación de HIF. Se sabe que HIF1 α presenta una vida media corta (aproximadamente 5 minutos) y se encuentra altamente regulada por los niveles de oxígeno (Salceda & Caro, 1997). Sin embargo, se sabe que el oxígeno no afecta a la transcripción y síntesis de HIF-1 α (Kallio *et al*, 1997; Wiesener *et al*, 1998). En concentraciones normales de oxígeno, la proteína HIF-1 α se degrada rápidamente (Wang *et al*, 1995a). Sin embargo, cuando las concentraciones de oxígeno es baja, HIF-1 α se estabiliza y se transloca desde el citoplasma al núcleo, donde forma un dímero con HIF-1 β , siendo activos los complejos formados (Huang *et al*, 1996). En definitiva, la regulación de la estabilidad y la actividad de HIF-1 α está controlada por modificaciones post-traduccionales, entre ellas, la hidroxilación y ubiquitinación (Brahimi-Horn *et al*, 2005).

La aparición de las dioxigenasas llamadas Prolil-hidroxilasas (PHDs) conllevó a que se convirtieran en las principales candidatas en ser los sensores de oxígeno celular, debido a que catalizan las reacciones de hidroxilación en el dominio ODDD de

HIF (Bruegge *et al*, 2007; Fandrey *et al*, 2006). Hasta el momento se han identificado cuatro isoformas de PHDs: PHD1, PHD2, PHD3, PHD4. Solo se ha demostrado que las isoformas que hidroxilan a HIF son: 1, 2 y 3 (Fandrey *et al*, 2006). Diferentes estudios han demostrado que existen diferencias entre estas enzimas (Appelhoff *et al*, 2004; Bishop *et al*, 2008; Takeda *et al*, 2006). Por ejemplo, PHD2 tiene más afinidad por HIF-1 α , mientras que PHD1 y PHD3 la tienen por HIF-2 α (Appelhoff *et al*, 2004). Además, cuando las PHDs son inactivadas por análogos del 2-OG aumenta la vida media de HIF-1 α (Ivan *et al*, 2002; Jaakkola *et al*, 2001). En el sitio activo de las PHDs, se encuentra Fe²⁺ unido débilmente por dos residuos de histidina y un ácido aspártico, formando un motivo de coordinación 2-histidina-1-carboxilato. El requisito de Fe²⁺ necesario para las PHDs se observó en que los quelantes de hierro y los hierros metálicos (como Co²⁺, Ni²⁺ y Mn²⁺) son capaces de estabilizar HIF-1 α , ya que es posible que disminuyan la disponibilidad de Fe²⁺ para la enzima o que sustituyan Fe²⁺ por Fe³⁺ en el sitio de unión (Masson & Ratcliffe, 2003; Yuan *et al*, 2003).

Las tres PHDs pueden hidroxilar a HIF-1 α *in vitro* según sus actividades relativas: PHD2 > PHD3 > PHD1. Se sabe que PHD2 es la enzima clave que controla el recambio de HIF-1 α *in vivo* (Berra *et al*, 2003). Por ejemplo, en condiciones de normoxia, el ARN interferente es capaz de silenciar a PHD2, siendo suficiente para estabilizar los niveles de HIF-1 α , mientras que el silenciamiento de PHD1 o PHD3 es incapaz de estabilizar HIF-1 α (Berra *et al*, 2003). Se sabe que PHD2 se localiza en el citoplasma, mientras que PHD1 se localiza en el núcleo y PHD3 en ambos compartimentos (Metzen *et al*, 2003). Aún así, PHD2 puede transportarse entre el citoplasma y el núcleo, lo que contribuye a la degradación de HIF-1 α en ambos compartimentos. Las tres enzimas se expresan en muchos tejidos. PHD1 es abundante en el testículo (Lieb *et al*, 2002), PHD2 en tejido adiposo (Oehme *et al*, 2002) y PHD3 en el corazón y la placenta (Lieb *et al*, 2002; Oehme *et al*, 2002). Por ello, las diferencias de la actividad enzimática de las PHDs, la localización subcelular y la distribución tisular permite que haya una respuesta específica dependiendo del tejido en respuesta a hipoxia. Además, varios segundos mensajeros modifican la actividad de las PHDs (Baek *et al*, 2005).

En condiciones de normoxia, HIF-1 α citoplásmico sintetizado es hidroxilado por estas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-OG) en prolina 402 (Pro402) y 564 (Pro564), ubicados ambos residuos en el dominio ODDD (Masson & Ratcliffe, 2003) (Srinivas *et al*, 1999) (Figura 1). Estos residuos de prolina se conservan en HIF-2 α (Pro405 y Pro531) y HIF-3 α . Cuando se mutan ambos residuos de prolina, se interrumpe la interacción entre HIF-1 α y la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL) y mejora su estabilidad. Sin embargo, HIF-1 α se estabiliza parcialmente cuando sólo se muta uno de los dos residuos de prolina (Masson *et al*, 2001). Las PHDs necesitan oxígeno, hierro y 2-oxoglutarato que actúen como co-factores en esta reacción (Bruegge *et al*, 2007) (Frede *et al*, 2006). En el proceso de hidroxilación, un átomo de oxígeno se transfiere al residuo de prolina y el otro reacciona con 2-OG para así, generar succinato y CO₂ (Bruick & McKnight, 2001). En normoxia, las PHDs se encuentran activas y son capaces de hidroxilar las prolinas de HIF-1 α , la proteína von Hippel-Lindau (pVHL) lo reconoce, actuando como una ligasa E3, lo cual promueve la ubiquitinación ligada a la lisina 48 (Lys48) y degradación de HIF-1 α mediada por el proteosoma (Ivan *et al*, 2001; Jaakkola *et al*, 2001). En hipoxia, no existe actividad enzimática, tampoco modificación de las prolinas y por tanto no existe la unión entre HIF-1 α y pVHL, se estabiliza HIF-1 α y se acumula en la célula (Epstein *et al*, 2001).

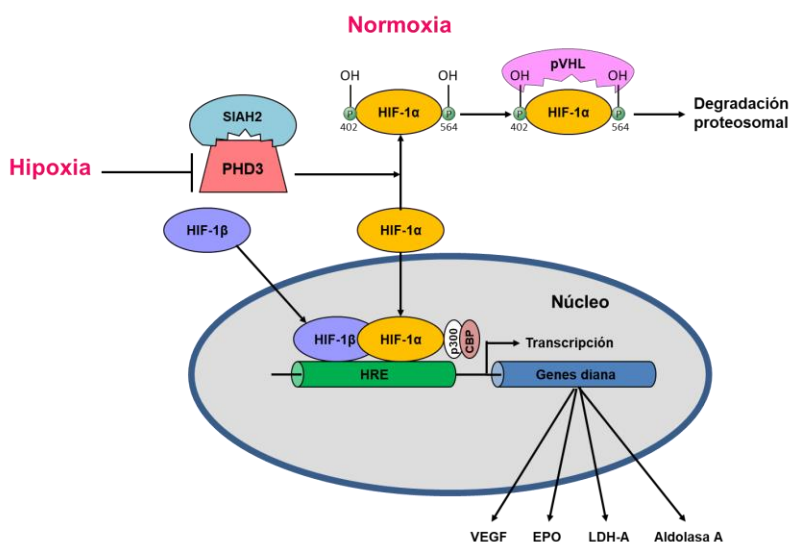


Figura 2. Esquema de la ruta de respuesta a hipoxia. En normoxia, las enzimas proil hidroxilasas (PHDs) hidroxilan a HIF-1 α , reconocido por pVHL, ubiquitinado y degradado por el proteosoma. En hipoxia, las PHDs se inactivan y no pueden hidroxilar los residuos de prolina y, por ello, HIF-1 α no es degradada. A continuación, HIF-1 α se une a HIF-1 β , se transloca al núcleo y activa la expresión de genes diana.

Existe un segundo mecanismo para controlar la actividad de HIF y es debido a la modulación de sus dominios de transactivación (N-TAD y C-TAD), los cuales se encargan de incorporar co-activadores transcripcionales como TIF2, CBP/p300 y SRC-1 (Carrero *et al*, 2000; Ema *et al*, 1999). En normoxia, el factor de inhibición de HIF-1 (FIH-1), localizado en el citoplasma, hidroxila el residuo de asparagina 803 (Asn803) en el C-TAD de HIF-1 α (Asn851 en HIF2 α), previniendo la interacción de HIF-1 α con CBP/p300 (Hewitson *et al*, 2002; Lando *et al*, 2002). La transcripción de FIH-1 es independiente de la cantidad de oxígeno y no presenta influencia en la estabilidad de HIF-1 α (Mahon *et al*, 2001). FIH-1, también es una dioxigenasa dependiente de 2-OG, permitiendo que se utilice como segundo sensor de oxígeno (Metzen *et al*, 2003).

Cuando los dos residuos de prolina de HIF-1 α son hidroxilados, la proteína pVHL puede unirse a HIF-1 α (Hon *et al*, 2002). Además, pVHL se asocia con las proteínas elongina B, elongina C, culina 2 y Rbx1 formando un complejo E3 ligasa VCB-Cul2 (Ivan & Kaelin, 2001). Así es como HIF-1 α se une a este complejo E3 multiproteico, dando lugar a la poliubiquitinación de HIF-1 α y posterior degradación por el proteosoma (Kamura *et al*, 2000). Este complejo se localiza en el citoplasma y se expresa ubicuamente en diferentes tejidos. Gracias al movimiento de este complejo entre citoplasma y núcleo se puede degradar HIF-1 α en ambos compartimentos (Groulx & Lee, 2002). También existen otras proteínas que afectan a la ubiquitinación y estabilidad de HIF-1 α . Entre otros, se sabe que la proteína Jab1, un coactivador transcripcional de c-Jun y JunD, incrementa los niveles de HIF-1 α en condiciones de hipoxia (Bae *et al*, 2002). La E3 ubiquitina ligasa oncogénica doble minuto murina (MDM2) lleva a cabo la ubiquitinación de HIF-1 α dependiendo de p53 (Ravi *et al*, 2000).

Hasta el momento, también se sabe que existe otro mecanismo de control de la expresión de las PHDs en respuesta a hipoxia, como es la degradación mediada por SIAH2 (seven in absentia homolog 2) (Pouyssegur *et al*, 2006). En respuesta a hipoxia leve (5% O₂), se incrementan rápidamente los niveles de ARNm de SIAH2, así como su actividad. SIAH2 puede interaccionar con las tres PHDs, aunque existe una importante degradación de PHD3 y en un menor grado de PHD1. Sin embargo, la estabilidad de PHD2 no se ve afectada. Este hecho puede deberse a la diferente

localización subcelular de las PHDs. En las células que carecen de SIAH2, los niveles de HIF-1 α son reducidos debido a que PHD3 puede hidroxilarlo y regular su estabilidad e inducir genes diana de HIF-1 α (Nakayama & Ronai, 2004).

1.4 Implicaciones de HIF-1 α en patologías

1.4.1 Implicaciones biológicas de HIF: Hasta día de hoy, se ha descrito muchos genes que son dependientes de este factor, los cuales tienen diferentes funciones y intervienen de manera diferente en los distintos procesos biológicos (Figura 3). HIF-1 actúa como un regulador principal de la expresión génica regulada por oxígeno en diferentes procesos fisiológicos (Manalo *et al*, 2005), entre los que hay que destacar:

-Angiogénesis: Es un proceso complicado en el cual se involucra una gran cantidad de productos génicos expresados en diferentes tipos celulares como consecuencia de una detección de oxígeno e inducción de genes pro-angiogénicos (Fong, 2008). Se necesita una citoquina estimulante, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), para comenzar la angiogenesis. Este factor interactúa con su receptor, VEGFR, que se expresa específicamente en células endoteliales haciendo que las células endoteliales se desprendan del vaso progenitor y migren al estroma. La hipoxia es el principal regulador de la expresión de VEGF, ya que es un objetivo transcripcional directo de HIF-1 α y HIF-2 α (Forsythe *et al*, 1996; Rankin *et al*, 2008). La inducción de angiogénesis conduce a un incremento en la densidad vascular y una disminución en la distancia de difusión de oxígeno.

-Proliferación y supervivencia celular: Existen genes diana de HIF-1 α como son los factores de crecimiento, en concreto, el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2) y el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) (Krishnamachary *et al*, 2003) (Feldser *et al*, 1999). Cuando estos factores se unen a sus receptores [el receptor del factor insulínico tipo 1 (IGF1R) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), respectivamente], se estimula las vías de transducción de señales las cuales se encargan de la activación de HIF-1 α y por consiguiente la proliferación y supervivencia celular (Semenza, 2003). En condiciones hipóxicas, se incrementa la actividad del Fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) que modula las vías de señalización de la tirosina quinasa y favorece la proliferación celular (Semenza, 2003).

-Eritropoyesis y metabolismo del hierro: En condiciones de hipoxia, la expresión de genes implicados en la eritropoyesis se encargan de regular la capacidad de los glóbulos rojos para transportar oxígeno. En concreto, el gen de la eritropoyetina (EPO) se encuentra aumentado por la hipoxia, la cual es indispensable para la formación de glóbulos rojos. Cuando hay un mayor número de glóbulos rojos existe una mejora en la administración de oxígeno a los tejidos (Farrell & Lee, 2004). También, se necesita la presencia de hierro para la formación del grupo hemo, convirtiéndose en el factor más limitante en la eritropoyesis. La hipoxia incrementa la expresión de los genes que se encargan de metabolizar el hierro, como son la transferrina, el receptor de transferrina y la ferroxidasa. Se sabe que el EPO está controlado por oxígeno, la transferencia del receptor y la expresión de la ferroxidasa están reguladas por HIF-1 (Ke & Costa, 2006).

-Metabolismo de la glucosa: El déficit de oxígeno cambia el metabolismo energético de las células, las cuales dejan de utilizar el ciclo del TCA puesto que es la vía metabólica dependiente de oxígeno. En su lugar, las células usan la ruta metabólica independiente de oxígeno como es la glucólisis, utilizándose como mecanismo primario en la producción de ATP (Dang & Semenza, 1999; Seagroves *et al*, 2001). Mientras que el ciclo del TCA aporta 38 ATP a partir de la glucosa, la glucólisis solo aporta 2 moléculas de ATP. Esto quiere decir, que la hipoxia necesita más glucólisis que la normoxia. Además, se han identificado un número elevado de genes implicados en la absorción de glucosa y genes diana de HIF-1 presentes en la glucólisis (Wenger, 2000). HIF-1 regula la expresión de todas las enzimas de dicha ruta y también la expresión de los transportadores de la glucosa, como son GLUT1 y GLUT3 que son los encargados de mediar la captación de la glucosa celular (Chen *et al*, 2001). Además, los metabolitos intermedios de la ruta glucolítica proporciona una serie de precursores necesarios para la síntesis de serina, pirimidina, purina, glicina y fosfolípidos, que son necesarios para el correcto crecimiento celular y mantenimiento de las células cuando se encuentran en condiciones de estrés (Harris, 2002).

-Metabolismo de la matrix y tono vascular: HIF-1 induce la expresión de los genes colágeno prolil hidroxilasa (Takahashi *et al*, 2000), metaloproteinasas de la matrix (MMPs) (Ben-Yosef *et al*, 2002) y los receptores e inhibidores del activador del plasminógeno (PAIs) (Kietzmann *et al*, 1999) puesto que bajo control hipóxico regula el metabolismo de la matrix y la maduración del vaso. En cuanto al tono vascular, HIF-1

también regula genes como el receptor adrenérgico α_{1B} (Eckhart *et al*, 1997), Adrenomedulina (ADM) (Cormier-Regard *et al*, 1998), Endotelina-1 (ET1) (Hu *et al*, 1998), Hemo oxigenasa-1 (HO-1) (Lee *et al*, 1997) y la sintasa de óxido nítrico (iNOS) (Melillo *et al*, 1995).

-Apoptosis: Se sabe que la hipoxia conduce a la muerte celular en varias circunstancias. HIF-1 es dependiente de p53, el cual es un gen involucrado en el control del ciclo celular. Además, cuando existe una inducción de genes proapoptóticos (Bax, NOXA, PUMA y PERP), p53 se encuentra implicada en la regulación de la apoptosis (Schuler & Green, 2001). También, se sabe que HIF-1 induce la transcripción de dos miembros de la familia pro-apoptóticos Bcl-2: BNIP3 y NIX. También, se ha relacionado con factores proapoptóticos, como la caspasa-3, Fas y el ligando de Fas (Volm & Koomagi, 2000). Todos ellos han sido relacionados con la inducción de la muerte celular (Kothari *et al*, 2003; Mu *et al*, 2003; Sowter *et al*, 2003).

-Otros: A parte de los procesos mencionados anteriormente, HIF-1 también se encarga de regular otros genes diana implicados en diferentes procesos, como es la adipogénesis (Yun *et al*, 2002), las reacciones inmunes (Hellwig-Burgel *et al*, 2005), la formación de cuerpos carótidos (Kline *et al*, 2002), el desarrollo de linfocitos B (Kojima *et al*, 2002).

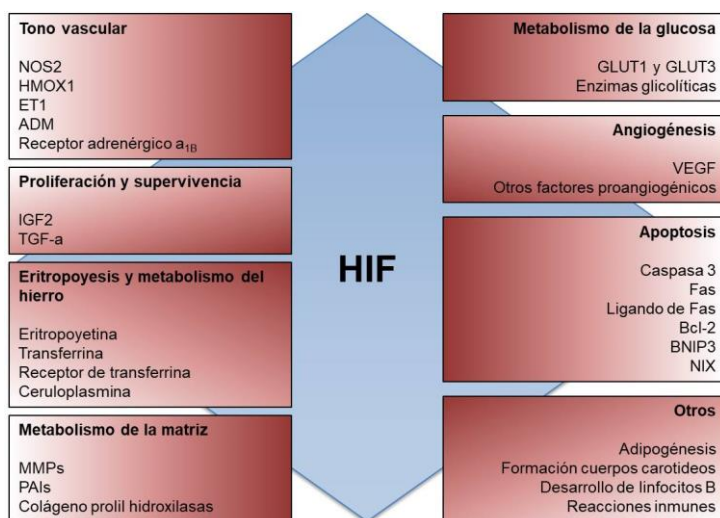


Figura 3. Implicaciones biológicas en la modulación de HIF-1 α . Se muestra un resumen de los procesos más importantes en los que interviene HIF-1 donde se intenta volver a un estado de normoxia.

1.4.2 Implicaciones fisiopatológicas de HIF: La ruta de respuesta a hypoxia ha sido relacionada con numerosas patologías humanas entre las que podemos destacar:

-Eritrocitosis hereditaria: Se ha observado que los individuos con exceso de producción de glóbulos rojos presentan mutaciones en los genes que codifican VHL, PHD2 y HIF-2 α , con lo que se comprueba el papel necesario que presenta esta vía en la regulación de la eritropoyesis (Yoon *et al*, 2011). Estas mutaciones perjudican la hidroxilación y la ubiquitinación, aumentando los niveles de HIF-1 α y HIF-2 α a cualquier presión de O₂. Las personas afectadas por esta enfermedad presentan cambios fisiológicos globales que incluyen respuestas vasculares ventilatorias y pulmonares alteradas por la hipoxia (Smith *et al*, 2006), así como respuestas metabólicas alteradas por el ejercicio (Formenti *et al*, 2010).

-Cáncer: Los tumores presentan regiones hipóxicas debido a las altas tasas de proliferación celular y la formación de vasculatura que es estructural y funcionalmente anormal. Se sabe que la pérdida de actividad de HIF da como resultado una disminución del crecimiento tumoral (Semenza, 2010a). En los cánceres humanos, existe una pérdida de función de VHL lo que conlleva a que HIF se active mediante alteraciones genéticas (Majmundar *et al*, 2010). Los HIF activan la transcripción de genes responsables del mantenimiento de células madre (Wang *et al*, 2011), evasión inmune (Lukashev *et al*, 2007), inmortalización celular, transición epitelio-mesenquimal (Mak *et al*, 2010), inestabilidad genética (Huang *et al*, 2007), vascularización (Liao & Johnson, 2007), regulación del pH (Swietach *et al*, 2007), invasión y metástasis (Chan & Giaccia, 2007) y resistencia a la radiación (Moeller *et al*, 2007), metabolismo de la glucosa (Luo *et al*, 2011).

Además, en la mayoría de los cánceres, cuando se inactiva la función de p53, se produce un aumento de los niveles de HIF-1 α y de su actividad transcripcional (Iliopoulos *et al*, 1996). Se piensa que el potencial de transformación del oncogen v-Src se debe en parte a la inducción de HIF y la ganancia de función de v-SRC incrementa la expresión de HIF-1 α y sus genes dependientes (Ravi *et al*, 2000). También, se ha comprobado que la mejora de la señalización de la tirosina quinasa del receptor HER2 aumenta la velocidad de síntesis de HIF-1 α (Laughner *et al*, 2001), importante en el cáncer de mama ya que se correlaciona con la agresividad tumoral y la supervivencia

del paciente. Así mismo, en diversos estudios se ha visto la existencia de una correlación entre la sobreexpresión de HIF-1 α y la mortalidad del paciente, el pronóstico precario o la resistencia al tratamiento (Semenza, 2003).

-Neovascularización isquémica: Se ha demostrado que HIF-1 tiene un papel importante en la activación de la transcripción del gen VEGF en células hipóxicas (Carmeliet *et al*, 1998), el cual media en la neovascularización isquémica. Un aumento en la expresión de la proteína HIF-1 α y VEGF conlleva a un aumento de la vascularización miocárdica (Martin *et al*, 1998). Para un desarrollo vascular óptimo se requiere la expresión de múltiples isoformas de VEGF y otros factores angiogénicos, como las angiopoyetinas. La terapia génica de HIF-1 α tiene el beneficio de inducir la expresión de múltiples factores que favorecen la angiogénesis y la supervivencia de las células del miocardio.

2. Respuesta a hipoxia en síndrome metabólico y diabetes

2.1 HIF-1 α , síndrome metabólico y diabetes

El síndrome metabólico es un grupo de factores de riesgo que aumenta el peligro de padecer enfermedades cardiovasculares. De todos ellos (Figura 4), los más importantes son: peso extra en la parte media y superior del cuerpo, resistencia a la insulina y niveles anormales de colesterol (Roberts *et al*, 2013). Se estima que aproximadamente un 20 o 25% de la población adulta mundial padece este síndrome y, además, es dos veces más probable que muera y sufra un ataque cardíaco en comparación con las personas sin este síndrome. En Europa, entre el 30 y 80% de los adultos padecen síndrome metabólico, mientras que en los niños es de aproximadamente el 20%. Las personas con síndrome metabólico también han demostrado tener un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (T2DM), convirtiéndose en una de las enfermedades crónicas más comunes en todo el mundo y la cuarta causa de muerte en el mundo (Tabish, 2007).

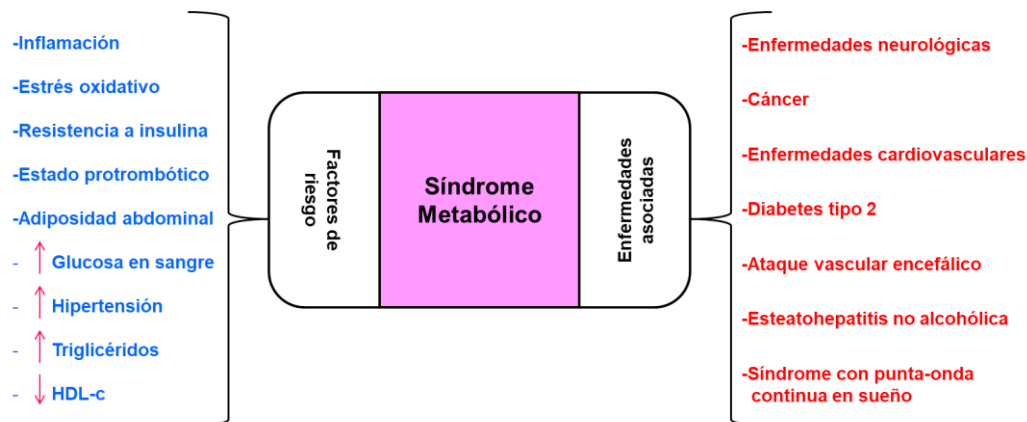


Figura 4. Factores de riesgo y enfermedades asociadas a síndrome metabólico. Se muestra un resumen de los principales factores de riesgo que juegan un papel fundamental en enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

Los dos principales factores de riesgo para T2DM son la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta. Estudios previos sugieren que las alteraciones en la señalización de HIF-1 α pueden ser perjudiciales en varias etapas de la patogénesis diabética, incluyendo el fallo innato de las células beta para secretar una cantidad suficiente de insulina (Cheng *et al*, 2010; Gunton *et al*, 2005), resistencia a la insulina (Ochiai *et al*, 2011; Yu *et al*, 2011), disfunción de los adipocitos e inflamación (Jiang *et al*, 2011). Por ejemplo, la hiperglucemia puede desestabilizar a las proteínas (Cheng *et al*, 2010; Gunton *et al*, 2005). Sin embargo, la insulina y otros factores de crecimiento pueden estabilizar HIF-1 α (Ochiai *et al*, 2011).

2.2 HIF-1 α y función de las células beta

La disfunción de las células beta conlleva a una inadecuada secreción de insulina. Cuando las células beta son normales, los elevados niveles de glucosa conducen a un incremento en su absorción y metabolismo a través de la glucólisis, el ciclo de Krebs y una cadena de transporte electrónico mitocondrial (Figura 5A). A partir de ADP se genera ATP en el metabolismo de la glucosa. Los canales de potasio que son sensibles al ATP se cierran, provocando la despolarización de la membrana y la liberación de insulina. Por lo que la captación alterada de glucosa puede afectar a la liberación de insulina glucosestimulada (GSIS).

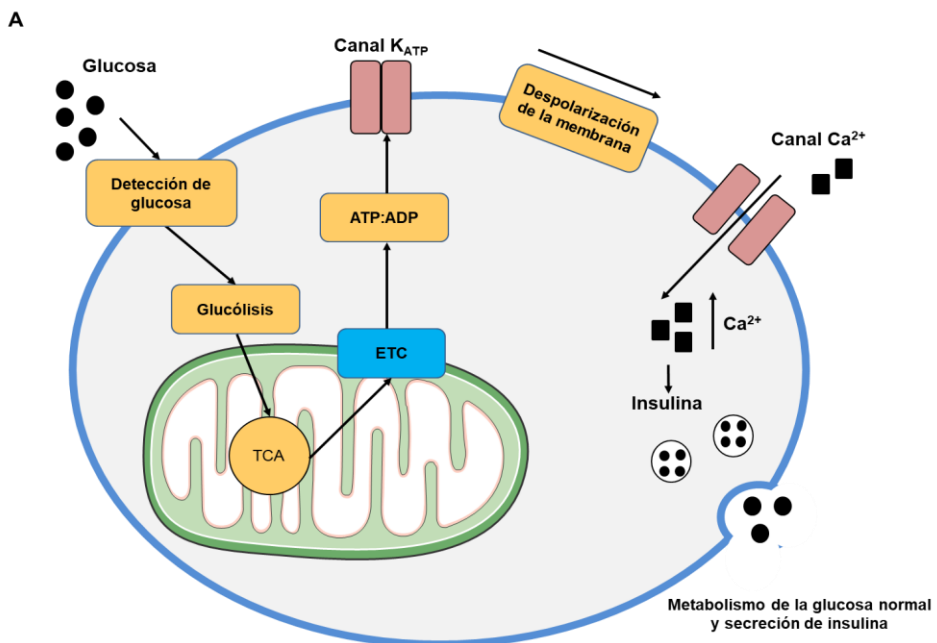
Se sabe que las personas que padecen T2D presentan islotes aislados que tienen un 90% disminuido la expresión de ARNT (ARNm) en comparación con los donantes tolerantes a la glucosa (Gunton *et al*, 2005). Estudios preliminares demuestran que cuando la expresión de ARNT (HIF-1 β) es baja en las células beta existe una secreción de insulina significativamente alterada, una expresión reducida de la enzima glucolítica y una desregulación de las vías metabólicas (Gunton *et al*, 2005; Pillai *et al*, 2011). Por lo que estos resultados sugieren que el ARNT tiene un importante papel en la función de las células beta. Otros estudios han comprobado que la proteína de unión a carbohidratos (ChREBP) es un regulador negativo de ARNT, por lo que la represión mediada por ChREBP del complejo HIF podría participar en la disfunción de células beta inducida por la glucotoxicidad (Noordeen *et al*, 2010).

Anteriores investigaciones han demostrado que cuando HIF-1 α se encuentra inactivado o silenciado en células beta, la secreción de insulina se ve afectada (Cheng *et al*, 2010). En otro estudio se demostró que ratones knock-out para β -ARNT presentaban una expresión disminuida de genes glucolíticos como la glucoquinasa y la fosfofructoquinasa, componentes clave de la maquinaria de detección de glucosa en células beta (Cheng *et al*, 2010). En cambio, cuando no existía la presencia de HIF-1 α se reducía la generación de ATP estimulada por glucosa y con ello la liberación de insulina (Figura 5B). Por ello, HIF-1 α puede regular la secreción de insulina. Esto demuestra que la absorción y el metabolismo de la glucosa por la cadena de transporte de electrones en células beta agotan la existencia de oxígeno. Cuando no hay oxígeno se induce HIF-1 α y se aumenta la glucólisis (Bensellam *et al*, 2012). Se necesita la presencia de pVHL para la proteólisis de HIF y, por lo tanto, su inactivación o silenciamiento aumentan la proteína HIF. Por ello, cuando las células carecen de esta proteína se observa una alteración de la secreción de insulina y la intolerancia a la glucosa (Choi *et al*, 2011) (Puri *et al*, 2009; Zehetner *et al*, 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, se requiere la presencia de hierro para llevar a cabo la hidroxilación y la degradación de HIF, por lo que los quelantes de hierro inducen aumentos moderados en los niveles de esta proteína. Se ha demostrado que la utilización de quelantes de hierro mejora la secreción de insulina (Cheng *et al*, 2010). Otros estudios han demostrado que la eliminación del inhibidor de

HIF-1 α , FIH-1, provoca igualmente un aumento en la expresión de HIF dando como resultado una mejora en la tolerancia a la glucosa (Zhang *et al*, 2010).

En definitiva, pequeños incrementos como los mencionados anteriormente, son beneficiosos para la función de células beta y supervivencia (Cheng *et al*, 2010; Stokes *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2010). También, se sabe que la deferoxamina mejora la supervivencia de los islotes en el trasplante de islotes, demostrándose que los ratones que presentaban un menor número de islotes transplantados pretratados con deferoxamina, se curaron de la diabetes. Estos islotes tratados con deferoxamina mostraban una mayor expresión de los genes proapoptóticos como Bax (Proteína X asociada a BCL-2) y Bak (proteína antagonista asesina de BCL-2) y una disminución de la expresión del gen antiapoptótico del linfoma de células B2 (Bcl-2) y una disminución de la apoptosis (Stokes *et al*, 2013). En otro estudio, los islotes humanos de personas con T2DM tienen una baja expresión tanto de HIF-1 α como de ARNT (Cheng *et al*, 2010). En resumen, existe un consenso sobre como el aumento de los niveles de HIF-1 α puede mejorar la función de la célula beta.



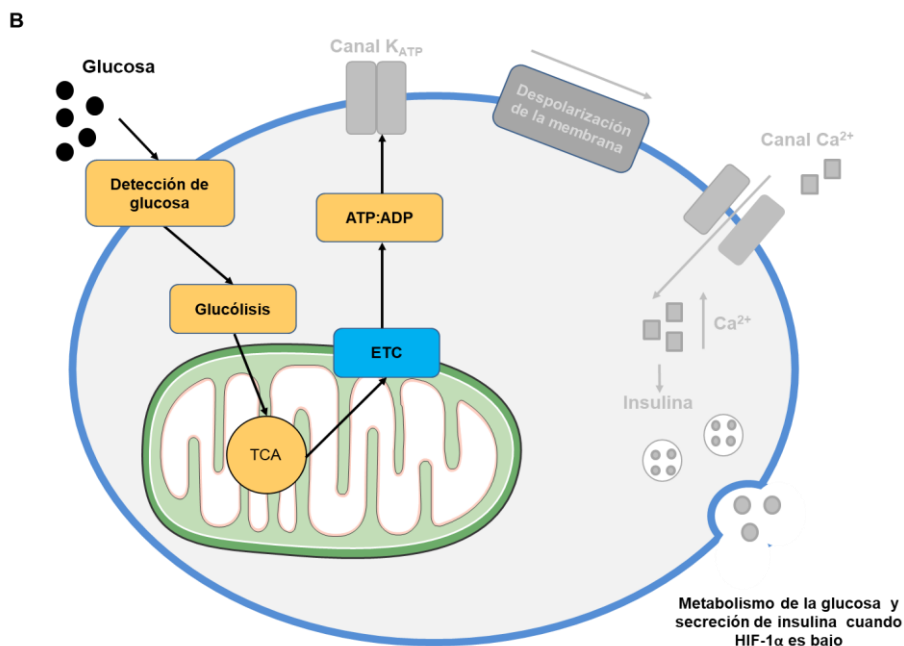


Figura 5. HIF-1 α y vías en la disfunción de las células beta en la diabetes. (A) En condiciones normales, la glucosa se absorbe y se rompe por la glucólisis proporcionando sustratos al ciclo de TCA y la cadena de transporte de electrones (ETC). Cuando se aumenta la relación entre ATP:ADP, se cierra los canales de potasio dependientes de ATP, lo que conduce a la despolarización de la membrana, a la apertura de los canales de calcio dependientes del voltaje, al aumento del calcio intracelular y secreción de insulina. **(B)** Cuando se disminuye HIF-1 α , se disminuyen los genes asociados con la detección de glucosa, la glucólisis, la cadena de transporte de electrones y una disminución en la generación de ATP, lo que conlleva a una disminución en la secreción de insulina.

2.3 Efecto de las *N*-acil dopaminas sobre HIF-1 α

Recientemente se ha demostrado la capacidad de una serie de moléculas endógenas, las *N*-acil-dopaminas (NADs), para inducir la estabilización de HIF-1 α a través de mecanismos independientes de receptor (Soler-Torronteras *et al*, 2014). Las *N*-acil-dopaminas (NADs) son productos de ácidos grasos de cadena larga unidos a la dopamina en el grupo amino y miembros de los endocannabinoides, y cuyo papel fisiológico sigue siendo en gran parte incierto (Connor *et al*, 2010). Las NADs con residuos de ácidos araquidónico (*N*-araquidonoil-dopamina, NADA), oleico (*N*-oleil-dopamina, OLDA), palmítico (*N*-palmitoil-dopamina, PALDA) y esteárico (*N*-estearoil-dopamina, STEARDA) han sido encontradas en el sistema nervioso de diferentes especies y en plasma humano (Chu *et al*, 2003; Hauer *et al*, 2013; Huang *et al*, 2002).

La síntesis de NADA tiene lugar a través de la conjugación directa de ácido araquidónico con dopamina (Hu *et al*, 2009) o tirosina (Akimov *et al*, 2007), lo que sugiere la posible existencia de otras especies endógenas de *N*-acil-dopamina. Entre ellos, NADA y OLDA han atraído un interés especial porque NADA se une al receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) y el receptor transitorio potencial vanilloide tipo 1 canal (TRPV-1) (Bisogno *et al*, 2000; Huang *et al*, 2002; Toth *et al*, 2003), y OLDA es un tipo de capsaicina lípido con actividad agonista completa de TRPV-1, pero desprovisto de afinidad por los receptores CB (Chu *et al*, 2003). Además de sus actividades ligando, se han descrito otras propiedades biológicas. Por ejemplo, NADA induce estrés oxidativo y apoptosis (Wojtalla *et al*, 2012), tiene propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias (Navarrete *et al*, 2009; Navarrete *et al*, 2010), y actividades antiproliferación e inmunomoduladoras (Dang *et al*, 2011; Yoo *et al*, 2013).

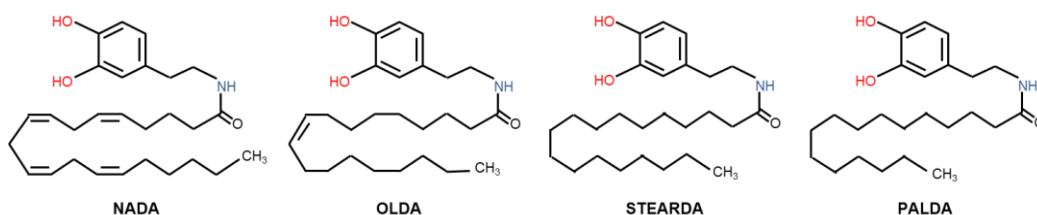


Figura 6. Estructura de las *N*-acil dopaminas. Todas las estructuras comparten una molécula de dopamina. Su diferencia es el ácido graso; NADA: ácido araquidónico, OLDA: ácido oléico, STEARDA: ácido esteárico, PALDA: ácido palmítico.

3. Metabolómica

3.1 Generalidades

La biología de sistemas estudia sistemas biológicos completos y procesos patológicos, con herramientas que permiten el análisis de alto rendimiento a gran escala, superando así las limitaciones de otras muchas técnicas que no tienen en cuenta la complejidad del organismo o de la enfermedad (Kordalewska & Markuszewski, 2015; Wojakowska *et al*, 2015). En esta área se incluyen las ciencias conocidas como “ómicas”: genómica (ADN), transcriptómica (ARNm), proteómica (proteínas) y metabolómica (metabolitos) (Aboud & Weiss, 2013; Kordalewska & Markuszewski, 2015). Mientras que los genes están sujetos a modulaciones epigenéticas, y las proteínas a modulaciones post-traduccionales, los metabolitos muestran el nivel funcional de un sistema biológico (células, tejidos, fluidos corporales, organismos) teniendo en cuenta además el estrés ambiental (Zhao & Lin, 2014). Por lo

tanto, los metabolitos (productos intermedios o finales) proporcionan una visión directa, integrada y más actualizada del estado de un sistema biológico (Fuhrer & Zamboni, 2015; Kordalewska & Markuszewski, 2015).

La metabolómica es un enfoque interdisciplinario donde se lleva a cabo un análisis global, imparcial, cualitativo y cuantitativo del metaboloma en un sistema biológico (Liesenfeld *et al*, 2013; Wojakowska *et al*, 2015). El metaboloma reúne el contenido total de metabolitos de una muestra biológica. El cuerpo humano está compuesto por aproximadamente 500 tipos de células diferentes, por lo que existen muchos metabolomas celulares diferentes, muchos compartimentos de fluido extracelular y diversos fluidos biológicos secretores y excretorios (Liesenfeld *et al*, 2013). Los perfiles metabólicos además de contener metabolitos endógenos, también contienen metabolitos que se originan de fuentes exógenas como son los fármacos, la dieta y la microbiota intestinal (Aboud & Weiss, 2013; Collino *et al*, 2013). Por todo esto, la metabolómica incluye el estudio de un gran número de moléculas pequeñas (moléculas de señalización, hormonas, intermedios metabólicos y metabolitos secundarios) como carbohidratos, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, ácidos orgánicos, péptidos, esteroides, aldehídos, vitaminas, aminas, cetonas, etc. (Aboud & Weiss, 2013; Collino *et al*, 2013; Zhao & Lin, 2014). La base de datos más completa sobre el metaboloma humano (Human Metabolome Database, HMDB) actualmente incluye más de 40,000 entradas de metabolitos. La variabilidad química del metaboloma requiere el uso de múltiples plataformas analíticas que permitan la medición simultánea de un amplio espectro de compuestos bioactivos (Wojakowska *et al*, 2015). Por otra parte, la metabolómica incluye múltiples áreas de la ciencia como la bioquímica analítica, la biología, la bioinformática, la epidemiología y la investigación clínica (Liesenfeld *et al*, 2013; Naz *et al*, 2014).

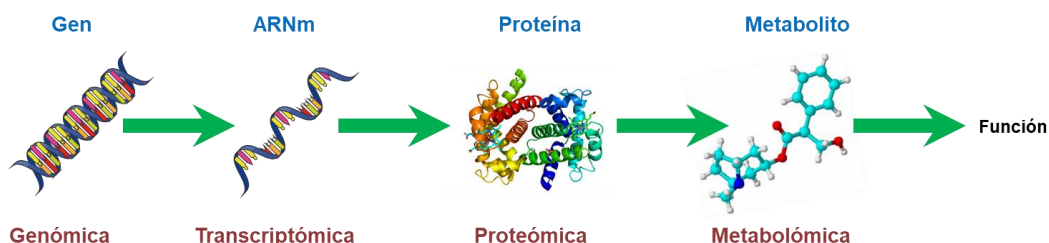


Figura 7: Esquema representativo de la metabolómica. Se muestra las ciencias ómicas que incluye esta disciplina.

3.2 Métodos y técnicas en un análisis metabolómico

Los estudios metabólicos se pueden dividir en dos enfoques diferentes para la detección de metabolitos: metabolómica dirigida y no dirigida (Naz *et al*, 2014). Presentan el objetivo de medir el mayor número de metabolitos simultáneamente, incluyendo la identificación de analitos provenientes de señales desconocidas, sin tener un conocimiento previo ni de la identidad ni de la naturaleza de los metabolitos evaluados, por lo que se debe de aplicar un pretratamiento mínimo para evitar la pérdida de metabolitos (Griffiths *et al*, 2010). Se utilizan diversas plataformas analíticas, como son la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectrometría de masas de cromatografía de gases (GC-MS) o la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). Sin embargo, la metabolómica no focalizada se limita a la información cualitativa y semicuantitativa, permitiendo identificar nuevas áreas de metabolismo y generar una hipótesis (Naz *et al*, 2014).

La espectroscopía de RMN es una herramienta analítica para la aclaración de la estructura de una molécula. En esta técnica se absorbe y se remite energía de los núcleos atómicos debido a las variaciones en un campo magnético externo. En el estudio de metabolómica, el principal análisis es el protón (^1H NMR) debido a su abundancia en la muestra biológica. Presenta la gran ventaja de proporcionar un análisis cualitativo y cuantitativo al mismo tiempo (Bothwell & Griffin, 2011). La espectrometría de masas de cromatografía de gases (GC-MS) es una técnica que implica la volatilización de la muestra calentada en un inyector y de la separación de sus componentes en una columna. Existe una diferencia entre la volatilidad y la polaridad de los compuestos, la cual es responsable de las diferentes distribuciones entre el gas portador (hidrógeno o helio) y una fase estacionaria. Cuanto menos tiempo pase un componente en la fase estacionaria, más rápidamente será eluido (Smith *et al*, 2014). La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) es necesaria para la metabolómica no dirigida y para el descubrimiento de nuevos metabolitos o biomarcadores. Los estudios de metabolómica generan una gran cantidad de espectros. Por este motivo, la selección de la instrumentación es muy importante ya que es un factor clave con respecto al número de picos detectados y su sensibilidad / especificidad. Debido a su alta resolución, su precisión de masa y su capacidad de adquisición del espectro completo, los analizadores de masa de alta resolución son

adecuados para desarrollar perfiles metabólicos en matrices biológicas complejas, como por ejemplo biofluidos o extractos de tejidos (Diaz *et al*, 2014; Rijk *et al*, 2009).

El enfoque dirigido es la cuantificación exacta de los metabolitos conocidos y esperados mediante el empleo de estándares analíticos. En este caso, las señales predefinidas específicas del metabolito se utilizan para cuantificar, con precisión y de manera correcta, las concentraciones de un número limitado de metabolitos (Naz *et al*, 2014). La preparación de la muestra y el ajuste óptimo del instrumento son pasos clave para realizar una cuantificación precisa de los metabolitos seleccionados. A diferencia de la metabolómica no dirigida, el enfoque específico está basado en hipótesis específicas que promueven la investigación de vías bioquímicas particulares (Griffiths *et al*, 2010).

Los diferentes enfoques en metabolómica incluyen: la detección global de todos los metabolitos detectables dentro de la investigación (huellas dactilares), el análisis de los metabolitos (huella), la selección de una clase particular de productos químicos (perfil del metaboloma), análisis de flujo (trazado de un compuesto, generalmente carbono marcado con isótopos, a través de una vía particular o conjunto de vías para determinar el destino del compuesto) y el análisis objetivo, donde se comparan uno o algunos metabolitos diana estrechamente relacionados. Para la interpretación de datos complejos se utiliza el análisis multivariado como el análisis de componentes principales (PCA), el análisis discriminante parcial de mínimos cuadrados (PLS-DA), el análisis discriminatorio de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) y el análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) (Worley & Powers, 2013). Existen una gran cantidad de herramientas para facilitar el análisis de estos datos.

3.3 Metabolómica en cáncer

Se ha demostrado que en la metabolización de muestras de tejido tumoral, el metabolismo celular se encuentra alterado en todos los tipos de cáncer (Seyfried & Shelton, 2010; Vander Heiden *et al*, 2009). En esta patología se transforma las células sanas en células tumorales utilizando principalmente glucosa y glutamato en la producción de energía necesaria para las células cáncerosas y para sintetizar ácidos grasos, aminoácidos, carbohidratos y nucleótidos necesarios en la síntesis de proteínas y proliferación celular (Kim & Dang, 2006; Vander Heiden *et al*, 2009). Por

todo esto, la metabolómica se puede utilizar para detectar metabolitos alterados en las rutas metabólicas del cáncer y también para controlar la terapia farmacológica contra esta patología. La metabolómica junto con los análisis histopatológicos procedentes de biopsias han contribuido a la identificación de un número elevado de metabolitos correlacionados con la agresividad del tumor (Brown *et al*, 2012).

Un perfecto biomarcador tumoral podría ser un metabolito secretado por un tumor, así como una vía metabólica o un proceso, el cual se puede utilizar para diagnosticar el cáncer, predecir la respuesta del paciente a las terapias y controlar la recurrencia (Winter *et al*, 2003). Los marcadores se pueden emplear para el diagnóstico, el pronóstico y la predicción del cáncer. Los marcadores se pueden detectar en fluidos corporales, como la sangre, la orina, el suero, las heces y la saliva, o bien, en tejidos, como las muestras del tejido o las biopsias del cáncer. Recientemente, se ha demostrado que los marcadores de compuestos orgánicos volátiles (VOC) cancerígenos pueden detectarse a través del aliento (Westhoff *et al*, 2009).

En el cáncer, la glucólisis se encuentra aumentada. Este hecho se conoce como el efecto “Warburg” donde las células tumorales aportan glucosa en la glucólisis (Kim & Dang, 2006). Ésta proporciona energía a las células cancerosas (Seyfried & Shelton, 2010), aunque hay indicios de que la glucólisis es una adaptación de las células tumorales a condiciones hipóxicas y que también produce metabolitos necesarios en el crecimiento de estas células (Israel & Schwartz, 2011; Vander Heiden, 2011).

En el metabolismo de la glucólisis tumoral se produce elevadas cantidades de ácido láctico, el cual es tóxico para la mayoría de los tipos celulares, sin embargo, es tolerado por las células tumorales (Tannock & Rotin, 1989). Al liberarse ácido láctico, el ambiente se convierte en ácido promoviendo la proliferación tumoral e invasión de las células sanas debido a la degradación de la matriz extracelular y a la angiogénesis (Gatenby & Gillies, 2004). El metabolismo de la glucosa también genera precursores de los aminoácidos, nucleótidos y lípidos que se necesitan para la proliferación de las células tumorales (Zamecnik *et al*, 1951). Se han observado la existencia de elevados niveles de ácidos grasos al principio de la progresión del cáncer y durante la

carcinogénesis (Bhalla *et al*, 2011). El NADPH es necesario para la síntesis de ácidos grasos produciéndose gracias al aumento de la glutaminólisis y a la regulación de la vía de la pentosa fosfato (PPP) en las células tumorales (Carracedo *et al*, 2013). También se ha demostrado que esta vía se regula durante la glucólisis para producir los nucleótidos necesarios para la síntesis de ARN (Boros *et al*, 2005). La glutamina es un aminoácido abundante y la glutaminólisis proporciona a las células tumorales otra fuente de energía cuando la producción de energía de la glucólisis es insuficiente. La glucosa y la glutamina pueden ser metabolizadas en ácidos nucleicos, aminoácidos y lípidos necesarios para la proliferación celular.

3.4 Metabolómica en cáncer de pulmón

Hoy en día, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte en el mundo. Dentro de esta patología, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) es el más común, el cual representa el 85% de todos los cánceres de pulmón. Dentro de los subtipos histológicos más importantes se incluyen el adenocarcinoma (AC), carcinoma escamoso de pulmón (SCC) y el carcinoma de células grandes (LCC), de los cuales AC y SCC representan aproximadamente el 90% de todos los casos (Falco *et al*, 2016). Normalmente, el diagnóstico tiene lugar después de la aparición de los primeros síntomas, que suele ocurrir cuando el tumor se encuentra en una etapa avanzada. Diferentes métodos como la tomografía computarizada y la broncoscopia han contribuido a la detección de la enfermedad, aunque no aumenta la probabilidad de un diagnóstico precoz (National Lung Screening Trial Research *et al*, 2011).

En la búsqueda de nuevos marcadores de cáncer que se apliquen con una metodología de cribado mínimamente invasiva, el campo de la metabolómica ha tenido un interés considerable en los últimos años (Aboud & Weiss, 2013). Las muestras que pueden analizarse en metabolómica incluyen células, fluidos o tejidos, siendo los biofluidos como la orina, sangre total, plasma, suero y saliva los más utilizados debido a que se puede obtener un método mínimamente invasivo. En el caso del cáncer de pulmón, el análisis del perfil metabolómico todavía está en sus etapas iniciales. Sin embargo, se han desarrollado diferentes aproximaciones para identificar metabolitos alterados a través del monitoreo de varios tipos de muestras como suero (Kumar *et al*, 2017), plasma (Louis *et al*, 2017), orina (Haznadar *et al*, 2016), esputo (O'Shea *et al*, 2016) (O'Shea *et al*, 2016) o sudor (Calderon-Santiago *et al*, 2015).

De las muestras obtenidas en suero, se identificaron cuatro metabolitos como son taurina, ácido ascórbico, glutamina y ácido pirúvico en suero para el cáncer de pulmón. Entre todos ellos, la taurina, el ácido aspártico y el ácido pirúvico se encuentran regulados positivamente, mientras que la glutamina se encuentra regulada negativamente en pacientes con cáncer (Kumar *et al*, 2017). De las muestras obtenidas en plasma, identificaron que las concentraciones plasmáticas de glutamina, glucosa, glicerol, isoleucina, leucina, glucoproteínas N-acetiladas, prolina, treonina, valina, aspartato, β -hidroxibutirato y lisina se encontraban incrementadas, mientras que las concentraciones de alanina, asparagina, citrato, lactato, lípidos no clorados, fosfatidilcolina y esfingomielina habían disminuido. Con ello confirmaron que la disminución de los niveles de los fosfolípidos mejora la síntesis de membrana en el cáncer de pulmón (Louis *et al*, 2017). De las muestras obtenidas en sudor, se identificaron cinco metabolitos que se encontraban alterados como son una trihexosa, una tetrahexosa, el ácido subérico, el monoglicérido MG (22: 2) y el ácido nonanoico (Calderon-Santiago *et al*, 2015).

Por otro lado, y aunque existe un gran interés en los estudios que utilizan tejidos tumorales, se han llevado a cabo muy pocos análisis, principalmente debido a la dificultad en obtener este tipo de muestras (Armitage & Southam, 2016). Aunque el uso de monitorear los niveles metabólicos como una herramienta para detectar las primeras etapas de algunas enfermedades oncológicas puede aplicarse a muestras fáciles de obtener, como son el suero o el plasma, y para saber que los cambios originalmente sufridos por el tejido es especialmente importante en la búsqueda de estos marcadores. No obstante, hasta la fecha, solo un número muy limitado de trabajos han analizado directamente las diferencias metabólicas en los tejidos. En un primer enfoque se analizaron extractos de tejido marcados con ^{13}C -glucosa de 12 pacientes donde se observó una alteración en la actividad del ciclo de Krebs y en la carboxilación del piruvato (Fan *et al*, 2009). Más tarde, se analizaron las diferencias entre el tumor y los tejidos pulmonares adyacentes de 12 muestras, encontrando un claro aumento en los niveles de fosfocolina, lactato y glicerofosfocolina (GPC) en tumores, mientras que la inosina / adenosina, acetato, mioinositol y glucosa disminuyeron (Rocha *et al*, 2010). Ese mismo año, también se describió el análisis de muestras de tejido de 14 sujetos con AC (9 sujetos) y SCC (5 sujetos) en comparación con muestras control (7 sujetos) (Jordan *et al*, 2010). En 2011, se realizó un análisis

metabolómico de LC de 7 pacientes, encontrando cambios significativos en 40 metabolitos (Hori *et al*, 2011). Después, se describió un perfil metabolómico de 9 muestras de tejidos tumorales de pulmón, lo que demuestra una alta actividad glucolítica en ellos (Kami *et al*, 2013). Finalmente, se ha descrito recientemente diferentes perturbaciones metabólicas asociadas con AC (Fahrman *et al*, 2017; Wikoff *et al*, 2015), y también se han analizado a través de los tumores metabolómicos de ¹H RMN emparejados y los tejidos control adyacentes de 56 sujetos con diferentes tipos de carcinomas pulmonares primarios (Rocha *et al*, 2015).

En definitiva, el silenciamiento de HIF-1 α y HIF-2 α en cáncer de pulmón sugiere una regulación del crecimiento tumoral e invasión que únicamente no se controla por la ausencia o presencia de HIF-1 α o HIF-2 α , sino que puede depender también de los niveles absolutos de HIF y las células tumorales específicas implicadas. La adición de inhibidores de HIF a las terapias actuales contra el cáncer de pulmón puede ser beneficiosa para controlar la progresión y metástasis del tumor.

3.5 Hipoxia en el metabolismo tumoral

El efecto Warburg, una característica general de todos los tumores, explica el cambio de metabolismo de la glucosa en las células tumorales en donde éstas convierten mayores cantidades de glucosa para así poder producir ácido láctico incluso cuando las células se encuentran en hipoxia. En el tejido normal, las células prefieren oxidar la glucosa en dióxido de carbono y así acoplar la glucólisis a la fosforilación oxidativa y al ciclo del ácido cítrico (Warburg, 1956). Se ha demostrado que HIF-1 α induce la expresión de transportadores de glucosa (Glut1 y Glut3) y enzimas glucolíticas como la fosfoglicerato cinasa 1 (PGK-1) la lactato deshidrogenasa A (LDHA), y hexocinasas (HK1 y HK2), los cuales presentan un papel muy importante en el cambio de la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaerobia (Gordan *et al*, 2007; Semenza, 2010b). Además, HIF-1 α también puede bloquear el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS) en las mitocondrias. Estudios previos observaron que en células de carcinoma deficientes en VHL, HIF-1 α se encargaba de regular negativamente la masa mitocondrial y el consumo de oxígeno debido a que c-Myc inhibía el co-activador 1 β del receptor activado por proliferadores de peroxisomas-gamma (PGC-1 β) (Zhang *et al*, 2007). También, hay artículos que indican que muchos genes involucrados en cáncer están asociados con la regulación de la glucólisis

aeróbica, como son cMyc, p53, y Ras (Huang *et al*, 2014). En conclusión, HIF es un mediador significativo del metabolismo en el cáncer humano.

En condiciones de normoxia, para obtener energía celular, la glucosa se transforma en piruvato en el citoplasma y luego éste se cataboliza en acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) entrando en el ciclo TCA y OXPHOS en el mitocondrias. Sin embargo, HIF-1 α activa la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), que inhibe la PDH por fosforilación en tumores sólidos (Kirito *et al*, 2009). Por ello, el piruvato no puede convertirse en acetil-CoA y como consecuencia, impide la producción de ATP a través del ciclo de TCA y OXPHOS. También, HIF-1 α puede proteger a las células del daño de las especies de oxígeno reactivo (ROS) mediante la activación de PDK-1. Además, HIF-1 α también ayuda a la respiración de las células hipóxicas ya que regula el cambio de la subunidad de la citocromo C oxidasa (COX-4) (Fukuda *et al*, 2007).

Además, las células tumorales hipóxicas tienen características únicas en el metabolismo de lípidos a través de la vía HIF. Se ha demostrado que la hipoxia promueve la síntesis de ácidos grasos a través de la activación de la proteína de unión al elemento regulador del esteroide (SREBP)-1 y la regulación ascendente de la sintasa de ácidos grasos (FASN) en la vía de señalización HIF (Furuta *et al*, 2008). También en células tumorales, la hipoxia produce acumulación de triglicéridos y gotas lipídicas. En este proceso, se ha comprobado que HIF-1 α contribuye directamente a la estimulación de la isoforma 1 de la fosfatidato fosfatasa (Lipin1), la cual se encarga de catalizar la biosíntesis de triglicéridos durante el penúltimo paso del proceso (Mylonis *et al*, 2012). Todo esto indica que la hipoxia puede estimular la síntesis de ácidos grasos y el almacenamiento de triglicéridos a través de la vía mediada por HIF-1 α en células tumorales. En otra investigación se observó que HIF-2 α es un regulador central del metabolismo de los lípidos hepáticos, incluida la síntesis, la oxidación y el almacenamiento, en donde el miembro 1 de la familia de la cadena larga de la acil-CoA sintasa (Acsl1) y la palmitoiltransferasa I de la carnitina (Cpt-1) disminuyeron por la activación de HIF-2 α . Cabe destacar que la activación de HIF-2 α causó esteatosis hepática severa incrementando el almacenamiento de lípidos hepáticos y eliminando la síntesis de lípidos y la oxidación de ácidos grasos.

Objetivos

IV. OBJETIVOS

Existen evidencias claras sobre la asociación entre las vías de respuesta a hipoxia y la fisiopatología del síndrome metabólico, donde tiene un papel destacado el factor de transcripción HIF-1 α y su regulación. Además, la posible existencia de mediadores lipídicos que pueden actuar como señales en estas vías relacionadas con la respuesta a la falta de oxígeno, indican la necesidad de un estudio detallado de la posible relación entre éstos y la enfermedad vascular periférica asociada a la T2DM. Por otro lado, aunque el conocimiento de los cambios en los niveles de metabolitos asociados a ciertas enfermedades oncológicas presentes en muestras fáciles de obtener (como suero o plasma) puede ser una herramienta muy eficaz para detectar los primeros estadios de desarrollo, conocer los cambios originalmente sufridos en el tejido de origen resulta especialmente importante como fuente principal de las alteraciones. Por todo esto, los objetivos del presente estudio han sido:

-Caracterizar la expresión de proteínas clave implicadas en la respuesta a hipoxia en células precursoras pancreáticas durante la diferenciación celular, y su posible uso como biomarcadores.

-Estudiar el papel de endolípidos con capacidad hipoximimética en la diferenciación de las células pancreáticas.

-Evaluar la relación entre ciertos endolípidos con capacidad hipoximimética y HIF-1 α en la enfermedad vascular periférica asociada a T2DM.

-Analizar el perfil metabólico de un número relevante de tejidos de cáncer de pulmón pertenecientes a los subtipos histológicos más prevalentes (AC y SCC) y su correspondiente tejido sano adyacente del mismo paciente.

-Observar los cambios bioquímicos obtenidos a nivel tisular en las diferentes muestras que pueden ser útiles para identificar biomarcadores y para aumentar el conocimiento de la reprogramación metabólica desarrollada durante la tumorigénesis en cáncer de pulmón.

Materiales y Métodos

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares y reactivos

Las células AR42J derivadas de células acinares pancreáticas fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM que contiene 4.5 g/L de glucosa y 0.5 g/L of L-glutamina, complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, EE.UU.) a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Las células precursoras derivadas de islotes humanos (hIPCs) fueron mantenidas en medio RPMI en las mismas condiciones, el cual contiene 2 g/L de glucosa y 0.3 g/L of L-glutamina. La hipoxia fue inducida mediante el cultivo de las células en un incubador Innova Co-48 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EE. UU.) a una concentración de 1% de O₂. La activina A humana recombinante se obtuvo de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.). El factor de crecimiento de hepatocitos humano (HGF), *N*-araquidonoil dopamina (NADA), mesilato de deferoxamina (DFX) y dopamina fueron adquiridos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). *N*-oleoil dopamina (OLDA) y *N*-palmitoil dopamina (PALDA) fueron suministrados por Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, EE.UU.). *N*-estearoil dopamina (STEARDA) fue obtenida de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). La solución stock de NADA, OLDA y PALDA (100 µg/ml, 20 mg/ml y 20 mg/ml, respectivamente) se preparó en etanol siguiendo las recomendaciones del fabricante y se almacenó a -20 °C durante no más de 2 meses. La dopamina y STEARDA, junto con las diluciones de las NADs anteriores, se prepararon en el momento del uso en tampón 1:1 etanol/PBS (pH = 7.2) siguiendo la recomendación del fabricante. En todos los experimentos, se estimuló el control con el vehículo correspondiente.

2. Western Blot y anticuerpos

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad celular media (2 x 10⁵ células / pocillo). Después de 12 h, y con una confluencia de 60-75%, el medio se reemplazó y las células se estimularon durante el tiempo indicado con los diferentes tratamientos. Las fracciones solubles de proteína fueron obtenidas después del lisado de las células en tampón NP-40 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol y 1% NP-40) suplementado con 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NAF, 1 µl/ml PMSF saturado, 10 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina y aprotinina. Luego las proteínas se diluyeron en tampón de carga SDS 1X y se hirvieron a 95 °C durante 3 minutos. A continuación,

estas proteínas fueron expuestas a una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno), se bloquearon con leche desnatada disuelta al 5% en tampón TTBS (tampón tris salino con Tween-20 0,1%) y se incubaron con anticuerpos primarios. Se añadieron anticuerpos secundarios y se detectaron mediante un sistema de quimioluminiscencia. Anti-HIF-1 α (610959) fue adquirido de BD Biosciences (Madrid, España); Los anticuerpos anti-SIAH2 (sc-5507), anti-NeuroD (sc-1084), anti-NGN3 (sc-1360002) y anti-PDX1 (sc-25403) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE. UU.) ; Anti-AFP (PAS-21004) procede de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE.UU.); Anti-PHD1 (ab108980), anti-PHD2 (ab109088) y anti-PHD3 se compraron de Abcam (Cambridge, Reino Unido) y anti- β -actina (AC-74) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

3. Inmunoprecipitación

Las células se recogieron y se lavaron en PBS por centrifugación. El pellet fue lisado en tampón de inmunoprecipitación (IP) (50 mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl y 1% Triton X-100) suplementado con 5 mM EGTA, 20 mM Na₄P₂O₇, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF y 10 μ g/ml de aprotinina, pepstatina y leupeptina. Los lisados celulares se incubaron con 1 μ g de los anticuerpos indicados durante 7 horas a 4 °C. Los anticuerpos fueron luego aislados con 50 μ L de proteína A/G Sepharose (sc-2003, Santa Cruz). Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron en tampón de carga SDS 2X y se inmunotransfirieron como se describió anteriormente.

4. Extracción de ARN y qRT-PCR

Las células AR42J y hIPCs fueron recogidas en PBS y se extrajo el ARN total usando el High Pure RNA Isolation kit (Roche, Basilea, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción de ARNm a ADNc se llevó a cabo con iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Madrid, España) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. RT-PCR fue realizada mediante GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, EE. UU.) en un sistema de detección iCYCLER (Bio-Rad). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95 °C y luego 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, un anillamiento de 30 segundos a 60 °C y una elongación final de 30 segundos a 72 °C. Se realizó un ciclo de 10 s a 83 °C y una extensión final de 1 min a 72 °C. Las eficiencias de amplificación se validaron

y normalizaron contra GADPH o β -actina, y el cambio de expresión génica fue calculado usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los cebadores utilizados en este estudio se muestran en la tabla 1.

Genes	Forward	Reverse
<i>hHIF-1α</i>	5'-GAAAGCGCAAGTCTTCAAAG-3'	5'-TGGGTAGGAGATGGAGATGC-3'
<i>rHIF-1α</i>	5'-GTTTACTAAAGGACAAGTCACC-3'	5'-TTCTGTTTGTGAAGGGAG-3'
<i>mHIF-1α</i>	5'-CCTGCACTGAATCAAGAGGTTGC-3'	5'-CCATCAGAAGGACTTGCTGGCT-3'
<i>hSIAH2</i>	5'-CTATGGAGAAGGTGGCCTCG-3'	5'-CGTATGGTGCAGGGTCAGG-3'
<i>rSIAH2</i>	5'-CGCCAGAAGTTGAGCTGCT-3'	5'-TGGTGGCATACTTACAGGGAA-3'
<i>mSIAH2</i>	5'-GTATGCTACCAAGGGCTGTT-3'	5'-ATGCATGAGATGGGACATCA-3'
<i>hPHD1</i>	5'-TATGCCACCAGGTACGCCATC-3'	5'-AGGAGCAGCCAGCACAGG-3'
<i>rPHD1</i>	5'-CTGGGCAACTACGTCATCAAT-3'	5'-TGCACCTTAACATCCCAGTTC-3'
<i>mPHD1</i>	5'-ATGGCTCACGTGGACGCAGTAA-3'	5'-CATTGCCTGGATAACACGCCAC-3'
<i>hPHD2</i>	5'-GGACGACCTGATACG-3'	5'-ACTTACCTTGGCATCC-3'
<i>rPHD2</i>	5'-CTGGGCAACTACGTCATCAAT-3'	5'-TGCACCTTAACATCCCAGTTC-3'
<i>mPHD2</i>	5'-TAAACGGCCGAACGAAAGC-3'	5'-GGGTATCAACGTGACGGACA-3'
<i>hPHD3</i>	5'-CCTCTTACGCAACCAGATATG-3'	5'-AGCACGGTCAGTCTTCAG-3'
<i>rPHD3</i>	5'-GACGCCAAGTTACATG-3'	5'-GGGCTCCACGTCTGTACAA-3'
<i>mPHD3</i>	5'-CTATGTCAAGGAGCGGTCCAA-3'	5'-GTCCACATGGCGAACATAACC-3'
<i>hINSULIN</i>	5'-TGTCCTTCTGCCATGGCCCT-3'	5'-TTCACAAAGGCTGCGGCTGG-3'
<i>rINSULIN</i>	5'-CCCCAGTGTCCTCCATCCT-3'	5'-TTTCCTGAGAGAGACGTTTTCCA-3'
<i>mSDF1</i>	5'-CAGAGCCAACGTCAAGCA-3'	5'-AGGTACTCTTGGATCCAC-3'
<i>mVEGFA</i>	5'-CATCTTCAAGCCGTCCTGTGT-3'	5'-CAGGGCTTCATCGTTACAGCA-3'
<i>mCOL1A2</i>	5'-CCGTGCTTCTCAGAACATCA-3'	5'-CTTGCCCCATTCAATTTGTCT-3'
<i>hHPRT</i>	5'-ATGGGAGGCCATCACATTGT-3'	5'-ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA-3'
<i>rGADPH</i>	5'-TTCAACGGCACAGTCAAGGC-3'	5'-TCACCCCATTTGATGTTAGCG-3'
<i>mGADPH</i>	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3'	5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'

Tabla 1. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa en células humanas y de rata.

En el caso de las muestras de pulmón, el ARN total se aisló de los tejidos almacenados en RNeasy® utilizando el Mini Kit Universal RNeasy Plus, el TissueLyser LT y un Qiacube (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de ARN total y la integridad se analizaron usando un sistema de electroforesis automatizado Experion® (Bio-Rad, CA, EE. UU.). Todas las muestras analizadas mostraron un valor RIN (RNA Integrity Number) superior a 9. Los kits y sistemas utilizados para llevar a cabo la retrotranscripción y RT-PCR fueron los mismos que se han mencionado anteriormente. En este caso, las eficiencias de amplificación se validaron y normalizaron contra β -actina, y el cambio de expresión

génica también se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se utilizaron los cebadores mostrados en la tabla 2.

Genes	Forward	Reverse
ADA	5'-CCATTTCTGCACACACGTATACC-3'	5'-TGCCAGGGCACATAATCA-3'
IMPDH2	5'-AGGGAAAGTTGCCATTGTAAA-3'	5'-TGGGTAGTCCCGATTCTTCTC-3'
GMPS	5'-ATGGCTCTGTGCAACGGAG-3'	5'-CCTCACTCTCGGTCTATGACT-3'
GMPR	5'-AATGTAGCCGTGAGTTCAGGC-3'	5'-GCCATAATGGTGTGTTTCAGGAAA-3'
XDH	5'-ACCGCTTCCACTACTTCAGCTAT-3'	5'-GCCATAATGGTGTGTTTCAGGAAA-3'
ATIC	5'-TCTGATGCCTTCTTCCCTTT-3'	5'-GCCATAATGGTGTGTTTCAGGAAA-3'
HPRT1	5'-AATTATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT-3'	5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC-3'
ITPA	5'-AGCTGGCTCTGCTCTGAGAAA-3'	5'-GCTGTAGGAGAGAGCAGTGAATCC-3'
ADSL	5'-TGGTGACAGAAAAGGCAGGA-3'	5'-GCGTATGTCGGTGCAAATCT-3'
ADSS	5'-AGGGGTAGAGAGTTTGGTGT-3'	5'-GTGCCAACGCAGTAAATCCA-3'

Tabla 2. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa en muestras de tejido de pulmón.

5. Ensayo de insulina en suero

Después de la estimulación, las células AR42J se lavaron e incubaron con 1,5 ml de tampón bicarbonato de Krebs-Ringer (KRBB) que contenía 143,5 mM NaCl, 5,8 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 25 mM HCO₃, 0,3% BSA (Sigma) y 3.3 mM de glucosa a 37 °C durante 1 hora. A continuación, las células se lavaron e incubaron con 1,5 ml del buffer KRBB suplementado con 27,7 mM glucosa durante 1 hora. El sobrenadante se guardó a -20 °C hasta que se utilizó para la detección de insulina mediante ELISA. La insulina total se midió en el suero de hIPCs o AR42J mediante un ELISA humano (10-1113-01) o de rata (10-1250-01) (Mercodia AB, Uppsala, Suecia), respectivamente.

6. Ensayo de angiogénesis *in vitro*

Para realizar el ensayo de angiogénesis con células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) se utilizó PrimeKit cryo (Essen Biosciences n° 4452 Ann Arbor, MI, EE. UU.). Los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) se sembraron en una placa de 96 pocillos y se co-cultivaron con células HUVEC que emiten inmunofluorescencia verde. Después de 12 h, las células se trataron con 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF) o con concentraciones crecientes de STEARDA o PALDA durante 48 horas. La formación del tubo se estudió en tiempo real utilizando el sistema de obtención de imágenes de células vivas Incucyte™ ZOOM (Essen Bioscience, Hertfordshire, Reino Unido).

7. Animales

Se obtuvieron ratones diabéticos macho db/db de 8 semanas (ratones BKS (D) -Lepr db / dbJOrlRj y sus heterocigotos normoglucémicos (BKS (D) -Lepr db / + JOrlRj) procedentes de Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Los animales se enjaularon individualmente en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h a 20 °C (\pm 2 °C) con una humedad relativa del 40-50% y se les proporcionó agua y alimentos estándar. Estos experimentos se realizaron de acuerdo con la normativa de la Unión Europea y aprobada por el Comité de Ética en Investigación Animal de la Universidad de Córdoba (2014PI / 024).

8. Modelo de cicatrización de heridas

Los ratones fueron anestesiados con 3% de isoflurano (Fatro, Barcelona, España). Se afeitó el vello posterior con una crema depilatoria y luego con una máquina de afeitar eléctrica. La piel se limpió con alcohol y se hicieron dos heridas a través de la panícula carnosa en la parte posterior a cada lado de la línea media con un trocar de biopsia de 6 mm. Se utilizó un apósito transparente (Tegardem; 3M) para cubrir las heridas después de la aplicación atópica de los tratamientos indicados, que se aplicaron con una aguja de calibre 30 cada dos días. Cada tratamiento fue analizado en 6 animales por grupo. Las muestras de tejido se recogieron 14 días después de la cirugía para análisis histológico y expresión de ARNm y proteína.

9. Análisis de heridas

Las fotografías digitales se tomaron el día de la cirugía y cada dos días después de la herida durante 14 días. Se usó una referencia circular para corregir la distancia entre la cámara y los animales. El área de la herida se calculó en píxeles con el software ImageJ 1.32 (NIH Image), utilizando el círculo como referencia para corregir el área de la herida y así expresarla como un porcentaje del área original.

10. Histología e inmunohistoquímica

Los tejidos de las heridas fueron procesados en parafina y secciones de 5 μ m fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) o tricrómico de Masson. Utilizamos una puntuación semicuantitativa para evaluar la regeneración epidérmica, la granulación y la formación de colágeno tal y como se describió anteriormente (Botusan *et al*, 2008; Galeano *et al*, 2003). Las secciones teñidas se puntuaron usando una escala de tres puntos para evaluar la reepitelización (1-poca regeneración, 2-

regeneración moderada y 3-regeneración completa), una escala de cuatro puntos para evaluar la formación de tejido de granulación (1, capa de granulación delgada; 2, capa de granulación moderada; 3, capa de granulación gruesa y 4, capa de granulación muy gruesa) y una escala de cinco puntos para evaluar la formación de colágeno (0, ausente; 1, mínimo-GT; 2, leve-GT; 3, moderado-GT; 4, marcado-GT). Para el análisis inmunohistoquímico, secciones de parafina de 5 µm se desparafinaron, rehidrataron y sumergieron en solución de recuperación de antígeno (tampón de citrato de sodio 10 mM, pH 6) a 95 °C durante 10 min. La peroxidasa endógena fue inactivada con peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 min a temperatura ambiente y las secciones se bloquearon en suero de cabra normal (20773, Merck Millipore) durante 30 min a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo anti CD31 (ab28364) (1: 100; Abcam) durante la noche a 4 °C. Luego, los portaobjetos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo biotinilado (21537, Merck Millipore). La reacción se reveló con 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Cromógeno 71897+ tampón 71898, Merck Millipore). Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina, seguido de deshidratación y montaje. La densidad vascular se evaluó contando los vasos por campo de secciones teñidas a 40x. Todos los portaobjetos se evaluaron de forma independiente por dos observadores usando seis secciones teñidas (al menos tres campos de cada sección) de cada grupo. Se utilizaron un microscopio Leica DM2500 y una cámara Leica DFC420c para la observación de las fotografías.

En el caso de las muestras de pulmón, la tinción inmunohistoquímica se realizó desparafinando secciones de 5 µm del tejido pulmonar y se rehidrataron en una serie graduada descendente de alcoholes. La tinción se llevó a cabo con el anticuerpo policlonal de conejo anti-ATIC (HPA021012, Sigma-Aldrich) a una dilución 1:200 o anticuerpo anti-ADSL (HPA000525, Sigma-Aldrich) a una dilución 1:100 durante toda la noche a 4 °C. La recuperación del antígeno se realizó incubando los portaobjetos en EDTA 1 mM pH 8,0 en un vaporizador a 98 °C-100 °C durante 20 minutos. La tinción se evaluó de la siguiente manera: 0, sin tinción o tinción débil en menos del 10% de las células; 1, 10-25% de las células teñidas; 2, 26-50% de las células teñidas; 3, 51-75% de las células teñidas; 4, más del 74% de las células teñidas.

11. Análisis de células progenitoras endoteliales (EPCs)

Se extrajo sangre periférica por punción cardíaca con una jeringa de 1 ml que contenía 5 mM EDTA (E7889, Sigma-Aldrich). Los glóbulos rojos (RBCs) se lisaron con buffer de lisis 1× RBC (555899, BD Biosciences) y se lavaron 3 veces (1700 rpm, 5 min, 4 °C) en tampón de lavado (PBS/0,1%NaN₃/1% FBS). Luego, 1x10⁶ células se resuspendieron en 100 µl de tampón de lavado en frío, se incubaron con los anticuerpos Sca-1 conjugado con FITC (557405, BD Biosciences), Flk-1 conjugado con PE (561052, BD Bioscience), IgG_{2a} conjugado con FITC, isotipo κ control (562058, BD Biosciences), IgG_{2a} conjugada con PE, control del isotipo κ (557076, BD Biosciences) en hielo y oscuridad durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron posteriormente dos veces en tampón de lavado en frío y se fijaron en BD CellFix (340181, BD Biosciences). Se excluyeron las células muertas con marcador de viabilidad *Fixable Viability Dye eFluor 780* (565388, BD Biosciences). Finalmente, las células Sca-1+/Flk-1+ se analizaron con un citómetro de flujo BD LSRFortessa™ y el software FACSDiva (BD Biosciences). Cada análisis incluyó al menos 50,000 eventos.

12. Cohortes de pacientes

Las muestras de tejido pulmonar procedentes de pacientes tratados quirúrgicamente para cáncer de pulmón primario se obtuvieron del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España) de Enero de 2011 a Diciembre de 2013. El Comité de Ética e Investigación Clínica aprobó la recolección y uso de las muestras de tejido que fueron almacenadas y gestionadas por el nodo de Córdoba perteneciente al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA). Todos los pacientes firmaron por escrito un documento de consentimiento informado que indica su donación voluntaria. Las muestras de tejido se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C hasta que se realizó el análisis. El resto de la muestra se fijó con formalina y se incluyó en parafina para estudios de diagnóstico convencional y análisis inmunohistoquímico. Todas las muestras fueron analizadas histológicamente y clasificadas como adenocarcinoma (n = 33), cáncer de pulmón de células escamosas (n = 35) o tejido pulmonar sano adyacente de todos los pacientes. Ninguno de los pacientes recibió quimioterapia o radioterapia antes de la operación y los datos clínico-patológicos fueron recopilados prospectivamente.

13. Análisis Metabolómico. Preparación de la muestra

El análisis metabólico fue realizado por Metabolon como se describió previamente (Reitman *et al*, 2011). Las muestras se prepararon usando el sistema automatizado MicroLab STAR® de la compañía Hamilton. Para fines de control de calidad se agregó un estándar de recuperación antes del primer paso del proceso de extracción. La preparación de la muestra se llevó a cabo utilizando dicho proceso con metanol acuoso para eliminar la fracción proteica y al mismo tiempo permitir la máxima recuperación de las moléculas pequeñas. El extracto resultante se dividió en cuatro fracciones: una para el análisis por UPLC/MS/MS (modo positivo), una para UPLC/MS/MS (modo negativo), una para Cromatografía de gases-espectrometría de masas GC/MS y una de reserva. Las muestras se colocaron brevemente en un TurboVap® (Zymark) para eliminar el disolvente orgánico. A continuación, cada muestra se congeló y se secó al vacío. Luego se prepararon las muestras para el equipo apropiado, ya sea UPLC/MS/MS o GC/MS.

14. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución/espectroscopia de masas (UPLC/MS/MS).

La porción de la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS) de la plataforma se basó en una cromatografía líquida de alta resolución ACQUITY (UPLC) y un espectrómetro de masas Thermo-Finnigan con trampa iónica lineal (LTQ), el cual consistió en una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masa con trampas de iones lineales (LIT). El extracto de la muestra se secó, luego se reconstituyó con disolventes ácidos o básicos compatibles con LC, cada uno de los cuales contenía 11 o más patrones de inyección a concentraciones fijas para asegurar la inyección y la consistencia cromatográfica (Evans *et al*, 2009). Se analizó una alícuota usando condiciones optimizadas de iones positivos ácidos y la otra usando condiciones optimizadas de iones negativos básicos en dos inyecciones independientes y en columnas separadas. Los extractos reconstituidos en condiciones ácidas se eluyeron en gradiente usando agua y metanol que contenía 0,1% de ácido fórmico, mientras que los extractos básicos, también se eluyeron en agua/metanol pero contenían 6,5 mM de bicarbonato de amonio. El análisis MS alternó entre escaneos MS y MS² dependientes de los datos usando dinámica de exclusión. Los archivos de los datos brutos se archivaron y se extrajeron como se describe a continuación.

15. Cromatografía de gases/espectroscopia de masas (GC/MS)

Las muestras destinadas al análisis de GC/MS se volvieron a secar en desecación al vacío durante un mínimo de 24 horas antes de derivatizarlas en nitrógeno seco utilizando bistrimetil-silil-trifluoroacetamida (BSTFA). La columna GC contenía un 5% de fenilo y la rampa de temperatura fue de 40° a 300°C en un período de 16 minutos. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas mono cuadrupolar de barrido rápido DSQ Thermo-Finnigan Trace utilizando ionización por impacto electrónico. El equipo se sintonizó y se calibró para mejorar la precisión y la resolución de masa diariamente. Los archivos de datos brutos fueron archivados y extraídos como se describe a continuación.

16. Garantía de calidad / Control de calidad

Para fines de garantía calidad / control de calidad (QA/QC), muestras adicionales fueron incluidas en el análisis de cada día. Estas muestras incluyeron extractos de un conjunto de plasma humano bien caracterizado, extractos de un conjunto creado a partir de una pequeña alícuota de las muestras experimentales y muestras control. Las muestras de QC se espaciaron de manera uniforme entre las inyecciones y todas las muestras experimentales se distribuyeron aleatoriamente a lo largo de la prueba. Se añadió una selección de compuestos QC a cada muestra para el alineamiento cromatográfico, incluidos los sometidos a prueba. Estos compuestos se eligieron cuidadosamente para no interferir con la medición de los compuestos endógenos.

17. Extracción de datos e identificación de compuestos

Se extrajeron los datos brutos, se identificaron los picos y se procesó el control de calidad utilizando el hardware y el software de Metabolon. Estos sistemas se basan en una plataforma de servicios web que utiliza las tecnologías .NET de Microsoft, que se ejecutan en servidores de aplicaciones de alto rendimiento y arrays de almacenamiento de canales de fibra agrupados para proporcionar una conmutación por error activo y un equilibrio de carga (Dehaven *et al*, 2010). Los compuestos se identificaron en comparación con las entradas de la biblioteca de estándares purificados o entidades desconocidas recurrentes. Metabolon mantiene una biblioteca basada en estándares auténticos que contienen el tiempo/índice de retención (RI), la relación masa a carga (m/z) y los datos cromatográficos (que incluyen datos

espectrales de MS/MS) en todas las moléculas presentes en la biblioteca. Además, las identificaciones bioquímicas se basan en tres criterios: índice de retención dentro de un estrecho margen RI de la identificación propuesta, coincidencia de masa nominal con la biblioteca ± 0.2 amu, y las puntuaciones directa e inversa MS/MS entre los datos experimentales y estándares auténticos. Los puntajes de MS/MS se basan en una comparación de los iones presentes en el espectro experimental con los iones presentes en el espectro de la biblioteca. Si bien puede haber similitudes entre estas moléculas en función de uno de estos factores, el uso de los tres puntos de datos puede utilizarse para distinguir y diferenciar los productos bioquímicos. Se han adquirido y registrado en LIMS más de 3500 compuestos estándar purificados disponibles en el mercado para su distribución a las plataformas LC y GC para la determinación de sus características analíticas. En base a la literatura y en las bases de datos KEGG/HMDB, los metabolitos se anotaron en una de las 8 "super-rutas" correspondientes a sus procesos metabólicos generales (aminoácidos, lípidos, carbohidratos, nucleótidos, péptidos, energía, cofactores y vitaminas y xenobióticos), y a una de las 73 "sub-rutas" que representan rutas metabólicas más específicas o subclases bioquímicas. Las tres redes (metabolito, sub-ruta y super-ruta) juntas representan el mapa jerárquico y se han utilizado en estudios previos (Krumsiek *et al*, 2012; Poisson *et al*, 2015).

18. Análisis y estadística de datos

Para el análisis de los datos correspondientes a la metabolómica, se importó un archivo final .csv conteniendo la información sobre el área de los metabolitos de todas las muestras en R (URL <http://www.R-project.org>) a través de la interfaz de Rstudio (URL <https://www.rstudio.com>) para más análisis estadísticos y gráficos. Se supone que los valores perdidos (si los hay) están por debajo del nivel de detección. Sin embargo, se asumió que los metabolitos que se detectaron en todas las muestras de uno o más grupos, pero no en muestras de otros grupos, estaban cerca del límite inferior de detección en los grupos en los que no se detectaron. En este caso, el nivel más bajo detectado de estos metabolitos fue imputado para las muestras en las que no se detectó ese metabolito. Se asignaron rutas para cada metabolito, permitiendo el examen de las vías representadas. Tras una transformación logarítmica y una imputación con valores mínimos observados para cada compuesto. Después de la imputación con valores mínimos observados, los conjuntos de datos se transformaron

logarítmicamente para análisis posteriores. El análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) se usaron como enfoques multivariantes supervisados y no supervisados para visualizar los cambios metabólicos que ocurren en los tejidos tumorales en comparación con el tejido sano. El PLS-DA se aplicó con una validación interna de 10 veces. Se usó una prueba *t* de dos muestras emparejadas para identificar metabolitos que difirieron significativamente entre el tumor y el tejido normal. Por otro lado, se aplicó una prueba *T* de dos muestras de Welch sobre las relaciones de los tejidos tumor/sano transformadas logarítmicamente para comparar los niveles de metabolitos en diferentes tipos de tumores. El mismo análisis se aplicó a nivel de super-rutas. Los paquetes R empleados para el análisis estadístico y la generación de gráficos fueron pheatmap 1.0.8, ggplot2 2.2.1, mixOmics 6.3.1 y MetaboAnalystR 0.0.0.9.

Los datos procedentes de análisis *in vitro* se expresaron como media +SD, mientras que los resultados procedentes de análisis *in vivo* se representaron como media +SEM. La prueba ANOVA de un factor seguido por las pruebas post hoc de Dunnett o la prueba *t* de Student de dos colas no pareadas se usaron para determinar la significación estadística. $P < 0.05$ se consideró significativo. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism® versión 6.01. Las imágenes se evaluaron y cuantificaron utilizando Image J.

19. Análisis de datos públicos de estudios de genómica del cáncer

Para analizar las alteraciones genéticas de *ADSL* y *ATIC*, incluidos los puntajes *z* de expresión de mRNA (Microarray, umbral 2.0), se analizaron los datos de la Red de investigación del Atlas del genoma del cáncer (TCGA) (Conjunto de muestras completas del Atlas PanCancer de Adenocarcinoma pulmonar y Carcinoma de células escamosas de pulmón) utilizando el software cBioportal (<http://www.cbioportal.org/>), y se visualizó utilizando un estándar Oncoprint que muestra las columnas alteradas. El efecto de la expresión génica de *ADSL* y *ATIC* sobre el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón se estudió utilizando curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con cáncer de pulmón con alta o baja expresión de *ADSL* y *ATIC* con datos procedentes de Kaplan-Meier Plotter (www.kmplot.com/analysis). Los datos fueron recolectados usando todos los pacientes disponibles restringidos al subtipo histológico por 120 meses. Los diagramas de

Kaplan-Meier se construyeron usando GraphPad Prism versión 6.0c, y se calculó una prueba de log-Rank para determinar las diferencias entre la supervivencia global según los niveles de ARNm de *ADSL* y *ATIC* por SPSS 11.5.0 para Windows.

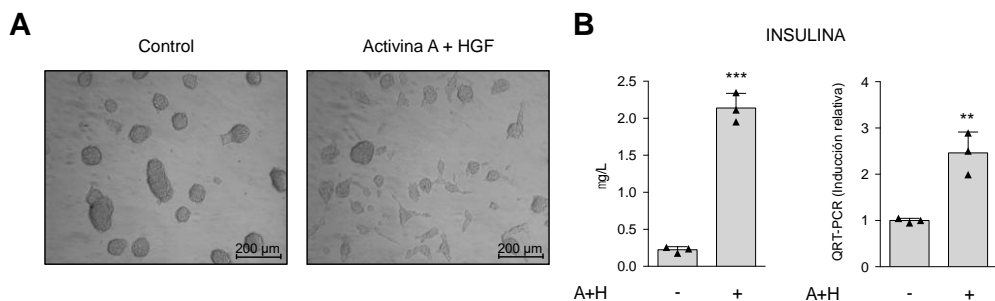
Resultados

VI. RESULTADOS

1. Efecto de las *N*-acil-dopaminas sobre la diferenciación de células beta y la cicatrización de heridas en ratones diabéticos

1.1 Caracterización de la vía de respuesta a hipoxia en la diferenciación celular de las células pancreáticas AR42J con activina A y HGF

Con el fin de investigar el efecto de las *N*-acil dopaminas (NADs) en la diferenciación a células beta, analizamos en primer lugar la expresión de las proteínas clave implicadas en la vía de respuesta a hipoxia en la línea celular AR42J (Machino



en la Figura 9, observamos un claro aumento en el nivel de expresión de estas proteínas tras la estimulación (Figura 9).

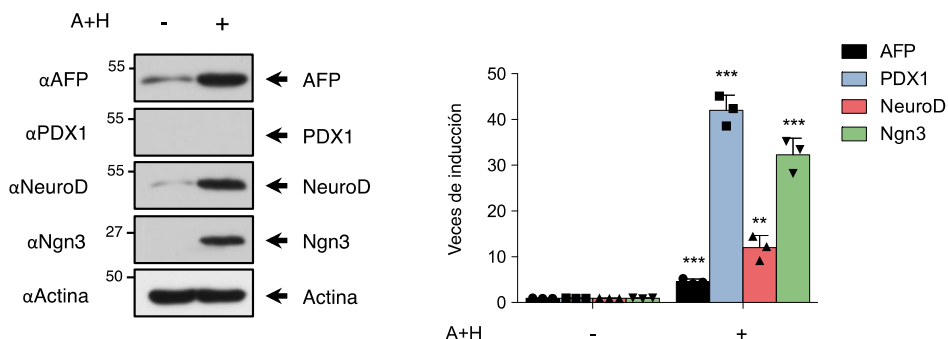


Figura 9. Activina A+HGF activan la reprogramación a células beta en AR42J. Las células AR42J se estimularon con Activina A (2 nM) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (100 nM) durante 48 horas y a continuación, las células se diferenciaron o no, se lisaron y se evaluaron para determinar la proteína endógena (AFP, PDX1, NeuroD y Ngn3) mediante Western Blot con los anticuerpos indicados. Se muestra un Western Blot representativo de tres experimentos independientes (lado izquierdo) y cuantificación (lado derecho). Los datos son media \pm SD de n = 3 experimentos. *** P <0,001 frente al grupo control y ** P <0,01 frente al grupo control (prueba t de Student de dos colas no pareadas).

A continuación, se analizaron los niveles de expresión de ARNm y proteína de las proteínas clave en la vía de respuesta a la hipoxia, como HIF-1 α , SIAH2 y prolin-hidroxilasas (PHD1, PHD2, PHD3). En la Figura 10, se detectaron cambios significativos en la expresión de ARNm de SIAH2, PHD1, PHD2, PHD3 (Figura 10B), que no se acompañaron de cambios a nivel de proteína (Figura 10A). Sin embargo, y como se representa en la Figura 10A, la estimulación con activina A y HGF fue capaz de inducir la proteína HIF-1 α .

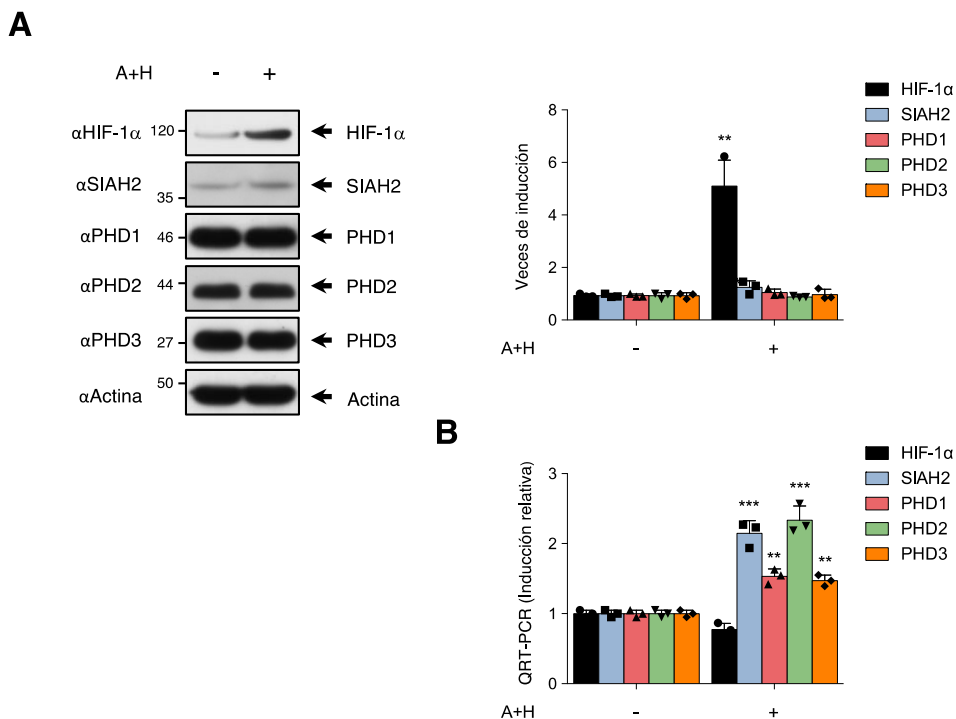


Figura 10. Activina A+HGF activan la vía de respuesta a hipoxia en la diferenciación celular de las células pancreáticas AR42J. (A) Las células AR42J se estimularon con Activina A (2 nM) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (100 nM) durante 48 horas y luego, las células se diferenciaron y la expresión de la proteína se evaluó mediante inmunotransferencia con los anticuerpos indicados. Se muestra un Western Blot representativo de tres experimentos independientes (lado izquierdo) y cuantificación (lado derecho). (B) En las mismas muestras, la expresión génica se analizó mediante qRT-PCR. Los datos son media \pm SD de $n = 3$ experimentos. ** $P < 0.01$ frente grupo control y *** $P < 0.001$ frente grupo control (prueba t de Student de dos colas no pareadas).

1.2 N-acil dopaminas inducen la expresión de HIF-1α en células AR42J durante la diferenciación a células beta

A continuación, decidimos estudiar el efecto de la inducción de HIF-1α en la diferenciación a células beta productoras de insulina en el modelo de células AR42J. Las células se sometieron a hipoxia (1% de O_2), se estimularon con Deferoxamina (DFX, agente mimético de hipoxia utilizado para estabilizar HIF-1α mediante la inhibición de PHDs) o se trataron con diferentes NADs [NADA (N), OLDA (O), STEARDA (S), PALDA (P)], usando dopamina (D) como control negativo. Como se muestra en la Figura 11, se indujo la expresión de proteínas implicadas en la

reprogramación de células beta (AFP, NeuroD, PDX1 y Ngn3) en respuesta a hipoxia, DFX y NADs. Sin embargo, la expresión de AFP no se vio afectada significativamente en respuesta a STEARDA (S) y PALDA (P).

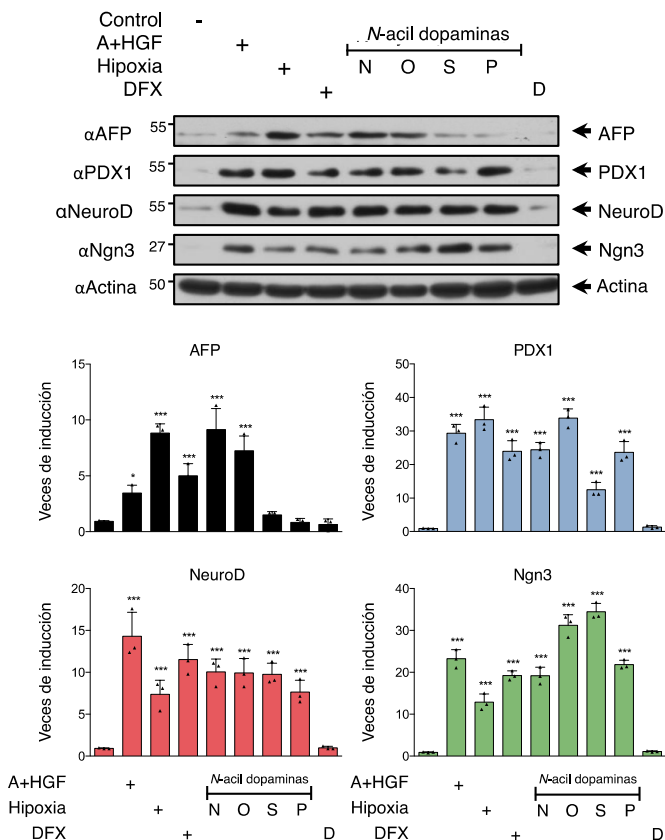
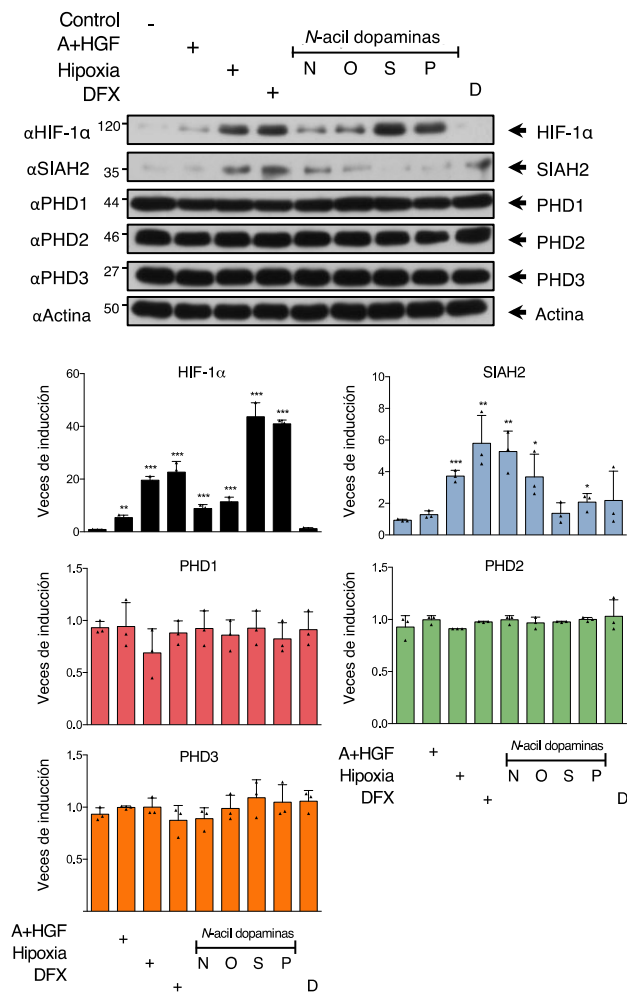


Figura 11. N-acil dopaminas inducen la diferenciación a células beta en células pancreáticas AR42J. Las células AR42J se diferenciaron o no, se sometieron a hipoxia (1% de O₂) durante 12 horas o se estimularon con DFX (10 μ M) o NADA (N) (10 μ M), OLDA (O) (10 μ M), STEARDA (S) (10 μ M), PALDA (P) (10 μ M) o Dopamina (D) (10 μ M) durante 48 horas, respectivamente. Los lisados celulares se analizaron para la expresión de proteínas mediante inmunotransferencias. Se muestra un Western Blot representativo de tres experimentos independientes (panel superior) y cuantificación (panel inferior).

En paralelo, se analizaron los niveles de expresión de proteína y ARNm de las proteínas clave en la vía de respuesta a la hipoxia (HIF-1 α , SIAH2, PHD1, PHD2, PHD3) (Figura 12A y B). Estos experimentos revelaron que las NADs inducían la expresión de HIF-1 α a nivel de ARNm y proteína de la misma manera que a la exposición de bajos niveles de O₂ (1%) o DFX, siendo STEARDA (S) y PALDA (P) los

mejores activadores. En cuanto a SIAH2, se detectó un aumento en la expresión de ARNm en respuesta a activina A + HGF y NADs, mientras que todos los estímulos presentaron una clara inducción a nivel proteico a excepción de activina A + HGF, STEARDA (S) y PALDA (P). Con respecto a la expresión de PHDs, se detectó una disminución de PHD2 y PHD3 en los niveles de ARNm en respuesta a NADs e hipoxia, y solo después de la estimulación con PALDA para PHD1. Por el contrario, los niveles de proteína no mostraron cambios significativos con ninguno de los tratamientos (Figura 12A y B). Esto podría deberse al mecanismo de autorregulación de los niveles de ARNm mediado por HIF-1 α , junto con el no efecto de las NADs en la expresión de la proteína PHDs.

A

B

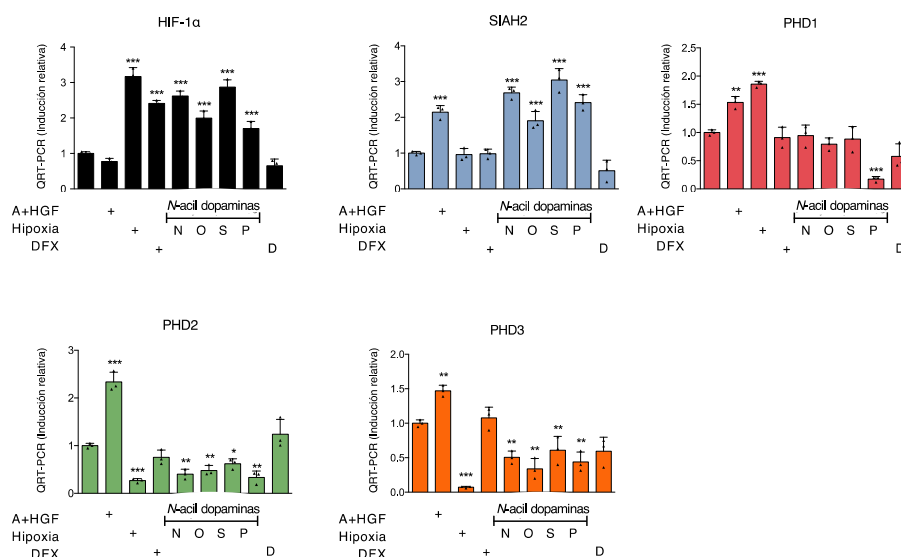


Figura 12. N-acil dopaminas inducen la expresión de HIF-1α en células AR42J durante la diferenciación a células beta. Las células AR42J se diferenciaron o no, se sometieron a hipoxia (1% de O₂) durante 12 horas o se estimularon con DFX (10 μM) o NADA (N) (10 μM), OLDA (O) (10 μM), STEARDA (S) (10 μM), PALDA (P) (10 μM) o Dopamina (D) (10 μM) durante 48 horas, respectivamente. **(A)** Los lisados celulares se analizaron para la expresión de proteínas mediante inmunotransferencias. Se muestra un Western Blot representativo de tres experimentos independientes (panel superior) y cuantificación (panel inferior). **(B)** En las mismas muestras, la expresión génica se analizó mediante qRT-PCR. Los datos son media ± SD de n = 3 experimentos. *P <0.05 frente al grupo control, ** P <0.01 frente al grupo control y ***P <0.001 frente al grupo control (ANOVA de un factor seguido de la prueba Dunnett).

Finalmente, analizamos la secreción de insulina en respuesta a estos estímulos. Como se muestra en la Figura 13, las células AR42J se convirtieron en células productoras de insulina en respuesta a los diferentes tratamientos, entre los cuales el estímulo con dopamina fue el menos significativo.

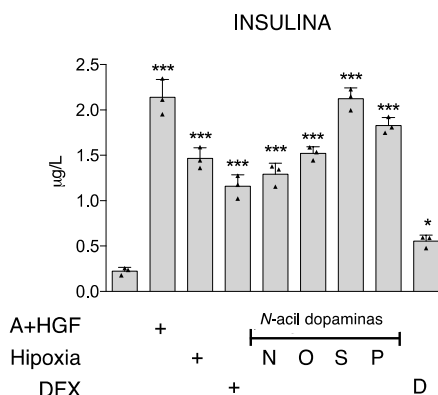


Figura 13. *N*-acil dopaminas inducen la línea celular AR42J a células productoras de insulina. Las células AR42J se sembraron en placas transwell de 24 mm, se estimularon con los mismos tratamientos y se incubaron con KRBB suplementado con glucosa a 3.3 mM durante 1 hora y luego se volvió a incubar con KRBB suplementado con glucosa a 27,7 mM durante 1 h. La secreción de insulina se analizó mediante ELISA. Los datos son media \pm SD de $n = 3$ experimentos. * $P < 0.05$ frente al grupo control, *** $P < 0.001$ frente al grupo control (ANOVA de un factor seguido de la prueba Dunnett).

Colectivamente, estos experimentos refuerzan la idea de que los niveles de HIF-1 α desempeñan un papel relevante en la disfunción de las células beta, y también cómo la inducción a nivel de proteína y ARNm mediado por NADs podría participar, al menos parcialmente, en la diferenciación celular de células pancreáticas AR42J a células beta productoras de insulina.

1.3 *N*-acil dopaminas inducen la expresión de HIF-1 α en células pancreáticas humanas (hIPCs) durante la diferenciación a células beta

Para confirmar la capacidad de las NADs para inducir la expresión de HIF-1 α y la diferenciación a células beta productoras de insulina, repetimos los mismos experimentos en una línea celular humana (hIPCs). Las células se sometieron a hipoxia (1% O₂), DFX o diferentes NADs. Como se muestra en la Figura 14, y como observamos anteriormente en las células AR42J, la expresión de AFP, NeuroD, PDX1 y Ngn3 se indujo en respuesta a hipoxia, DFX y NADs. La expresión de AFP fue menos intensa en respuesta a STEARDA (S) y PALDA (P).

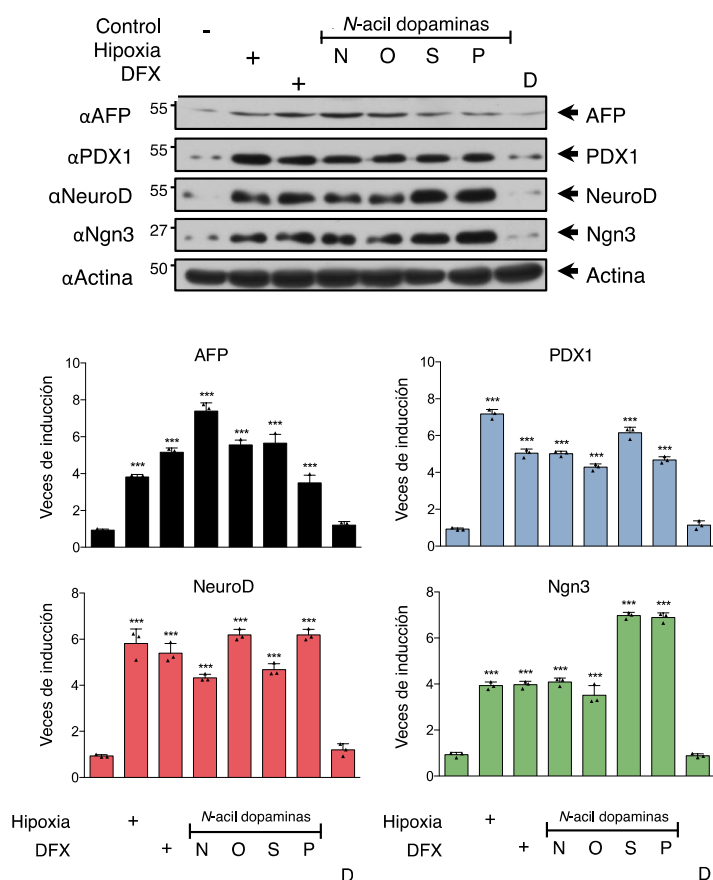
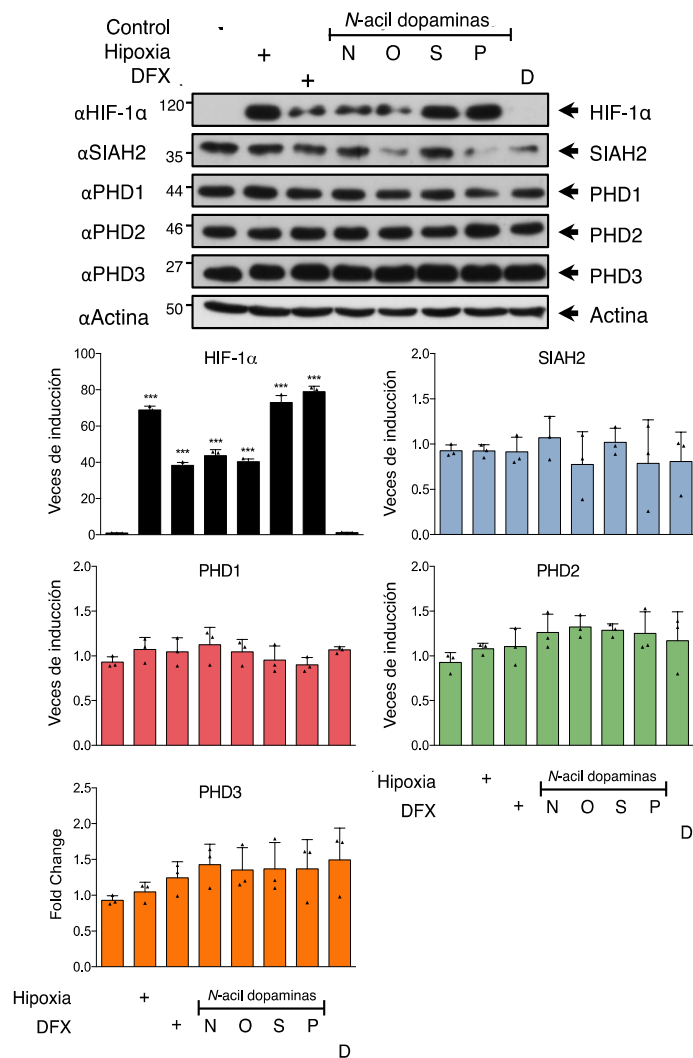


Figura 14. N-acil dopaminas inducen la diferenciación a células beta en células pancreáticas humanas hIPCs. Para llevar a cabo la diferenciación a células beta, las células hIPCs se sometieron a hipoxia (1% de O₂) durante 12 horas o se estimularon con DFX (10 μ M) o NADA (N) (10 μ M), OLDA (O) (10 μ M), STEARDA (S) (10 μ M), PALDA (P) (10 μ M) o Dopamina (D) (10 μ M) durante 48 horas, respectivamente. Las células se recogieron y se utilizó para determinar los niveles de las proteínas indicadas mediante inmunotransferencia con los anticuerpos correspondientes. Se muestra un Western Blot representativo de tres experimentos independientes. Mostramos una transferencia Western representativa de tres experimentos independientes (panel superior) y cuantificación (panel inferior).

A continuación, analizamos los niveles de expresión de ARNm y proteína de HIF-1 α , SIAH2, PHD1, PHD2 y PHD3 (Figura 15A y B). NADs indujeron la expresión de HIF-1 α a nivel de proteína y ARNm de manera similar a DFX y no se observaron cambios significativos en respuesta a PALDA (P) en esta línea celular. También observamos una clara inducción de HIF-1 α (nivel de proteína y ARNm) en respuesta a

hipoxia y DFX. El nivel de proteína SIAH2 se inhibió parcialmente en respuesta a OLDA (O), PALDA (P) y dopamina (D), sin detectar cambios significativos en el nivel de ARNm. Los niveles de proteína PHD1, PHD2, PHD3 no mostraron cambios significativos con ninguno de los tratamientos (Figura 15B). En los niveles de ARNm, no se detectaron cambios, a excepción de los niveles de PHD2 que mostraron una inducción significativa con todos los tratamientos a excepción de PALDA (P).

A

B

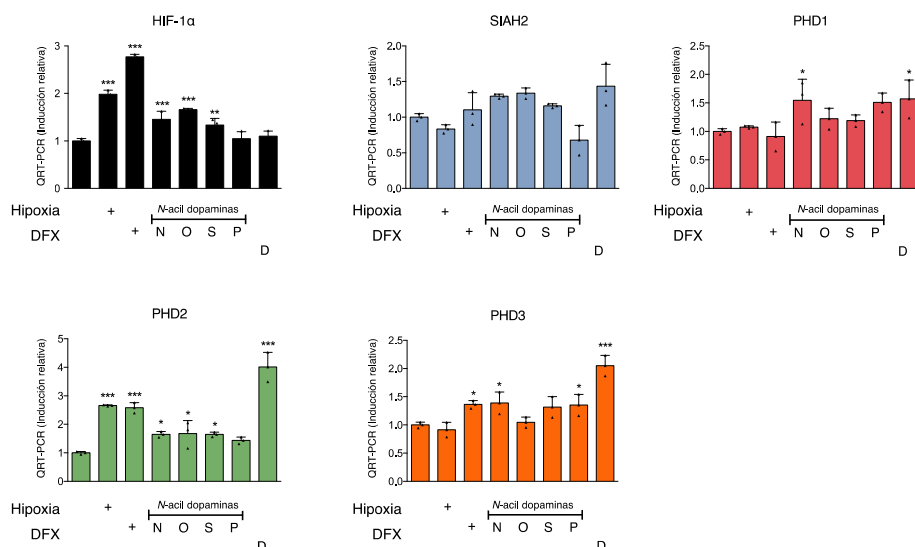


Figura 15. *N*-acil dopaminas inducen HIF-1α en células hIPCs durante la diferenciación a células beta. Para llevar a cabo la diferenciación a células beta, las células hIPCs se sometieron a hipoxia (1% de O₂) durante 12 horas o se estimularon con DFX (10 μM) o NADA (N) (10 μM), OLDA (O) (10 μM), STEARDA (S) (10 μM), PALDA (P) (10 μM) o Dopamina (D) (10 μM) durante 48 horas, respectivamente. Las células se recogieron y se dividió en dos alícuotas: **(A)** Una alícuota fue utilizada para determinar los niveles de las proteínas endógenas mediante Western Blot utilizando los anticuerpos correspondientes. Se muestra un Western Blot representativo de tres experimentos independientes (panel superior) y cuantificación (panel inferior), **(B)** mientras que con otra alícuota se analizó los niveles de ARNm mediante qPCR. Los datos son media ± SD de n = 3 experimentos. **P* < 0.05 frente grupo control, ***P* < 0.01 frente grupo control y ****P* < 0.001 frente grupo control (ANOVA de un factor seguido de la prueba Dunnett).

Finalmente, analizamos la secreción de insulina en respuesta a estos estímulos (Figura 16). Como se observó con las células AR42J, las células hIPCs se convirtieron en células productoras de insulina en respuesta a los diferentes tratamientos. En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que la inducción de HIF-1α en respuesta a estímulos como hipoxia o *N*-acil-dopamina podría desempeñar un papel importante en la diferenciación celular y la secreción de insulina.

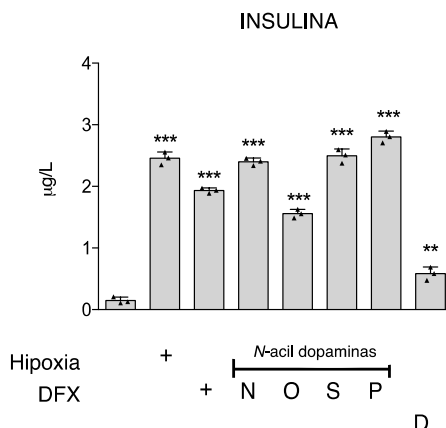


Figura 16. *N*-acil dopaminas inducen la línea celular hIPCs a células productoras de insulina. Las células hIPCs se sembraron en placas transwell de 24 mm y se estimularon con los tratamientos indicados. La secreción de insulina se analizó mediante ELISA. Los datos son media \pm SD de $n = 3$ experimentos. ** $P < 0.01$ frente grupo control, *** $P < 0.001$ frente al grupo control (ANOVA de un factor seguido de la prueba Dunnett).

1.4 STEARDA y PALDA inducen HIF-2 α y promueven la angiogénesis *in vitro*

A continuación, decidimos investigar el efecto de las NADs sobre el nivel expresión de HIF-2 α . STEARDA y PALDA se seleccionaron debido a su mayor capacidad para inducir HIF-1 α mostrado en experimentos previos (Figura 17A y B). HIF-2 α es la segunda isoforma de HIF, la cual regula numerosos genes implicados en el metabolismo de la glucosa y la angiogénesis (Prabhakar & Semenza, 2015; Zheng *et al*, 2015). Estudios previos han demostrado que la activación del HIF-2 α hepático mejora la homeostasis de glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina al estabilizar la vía de señalización del sustrato del receptor de insulina (IRS2)-AKT (Taniguchi *et al*, 2013; Wei *et al*, 2013). Recientemente, se ha demostrado que HIF-2 α es esencial para la regulación posprandial aguda de la señalización hepática del glucagón, señalando este factor de transcripción como un posible objetivo terapéutico en el tratamiento de la diabetes (Ramakrishnan *et al*, 2016). En la Figura 17 se muestra que tanto STEARDA como PALDA inducían la expresión del nivel de proteína de HIF-2 α de la misma manera que la exposición a DFX o el estímulo de activina A+HGF en células AR42J (Figura 17A) y hIPCs (Figura 17B).

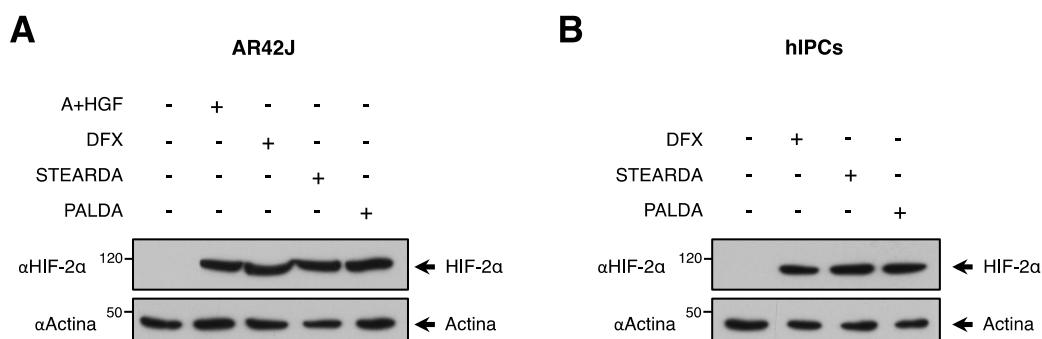


Figura 17. STEARDA y PALDA estabilizan HIF-2α en AR42J y hIPCs. Las células AR42J se diferenciaron o no (**A**), y junto con las células hIPCs (**B**) se estimularon con DFX (10 μ M), STEARDA (10 μ M) o PALDA (10 μ M) durante 48 horas. Las células se lisaron y los niveles de proteína endógena de HIF-2α se evaluaron mediante Western blot con el anticuerpo específico. Mostramos un Western Blot representativo de tres experimentos independientes.

A continuación, y para determinar inicialmente las consecuencias de la inducción de HIF-1α y HIF-2α mediada por STEARDA y PALDA, decidimos estudiar su efecto sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos. Las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) co-cultivadas con fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) se estimularon con STEARDA y PALDA y la tubulogénesis se cuantificó en tiempo real usando el sistema de obtención de imágenes de células vivas Incucyte ZOOM. El factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (RhEGF) se usó como control positivo para este experimento (Figura 18). La estimulación con STEARDA y PALDA con diferentes concentraciones dio como resultado un aumento en la formación de estructuras tubulares. Observamos un aumento en la muerte celular después del estímulo con PALDA a la concentración más alta.

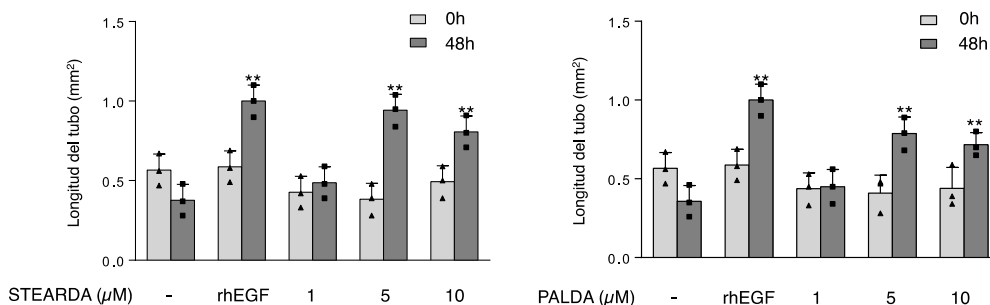


Figura 18. STEARDA y PALDA promueven la angiogénesis *in vitro*. Los fibroblastos dérmicos humanos normales y HUVEC se sembraron e incubaron con las concentraciones indicadas de STEARDA o PALDA durante 48 horas. Se utilizó rhEGF (10 ng/ml) como control positivo. El cribado para la formación mejorada de tubos HUVEC se realizó *in vitro* después del tratamiento con o sin los endolípidos. Los datos son media \pm SD de $n = 3$ experimentos. ** $P < 0.01$ vs. grupo control. Mostramos un Western Blot representativo de tres experimentos independientes (prueba t de Student de dos colas no pareadas).

1.5 Efecto de cierre de la herida con *N*-acil dopaminas en ratones diabéticos tipo 2

Entre las diversas complicaciones asociadas a la diabetes, la úlcera del pie diabético constituye el trastorno más prevalente y conduce a la cicatrización tardía de la herida (Alexiadou & Doupis, 2012). A continuación, investigamos los efectos de las NADs en un modelo de ratón con cicatrización de heridas de diabetes tipo 2. Como se muestra en la Figura 19, los animales tratados con STEARDA y PALDA mostraron una mejor cicatrización de las heridas después del día 14, en comparación con los no tratados o tratados con DFX. El análisis histológico mostró que los estímulos con STEARDA o PALDA mejoraron la curación de las heridas en ratones diabéticos.

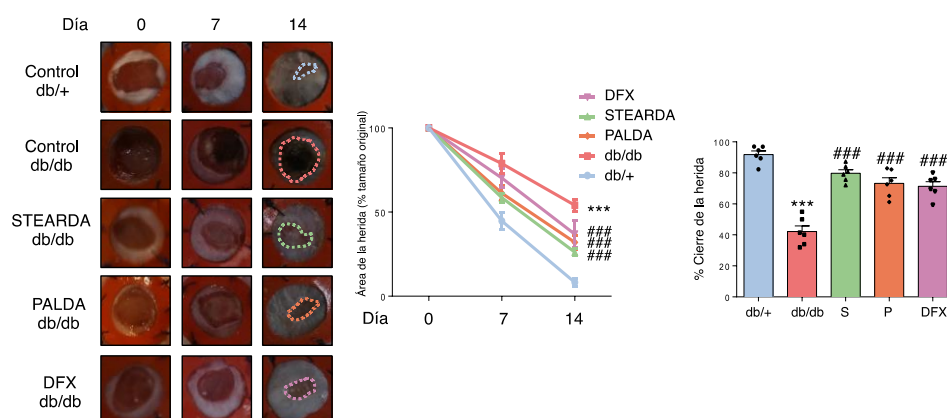


Figura 19. Efecto de cicatrización de heridas de STEARDA y PALDA en ratones diabéticos tipo 2. Los ratones se dividieron en 5 grupos. Un grupo control de ratones no diabéticos (db/+) y otro grupo control de ratones diabéticos (db/db) tratados tópicamente con vehículo (10% DMSO, 10% propilenglicol, 80% solución salina), otros dos grupos de ratones db/db tratados tópicamente con STEARDA o PALDA 150 μ M, respectivamente. El quinto grupo de ratones db/db se estimuló tópicamente con 1 mM de DFX, utilizado como control positivo. Las heridas se fotografiaron a los 0, 3, 7, 10, 14 días. Se realizó un análisis cuantitativo del área de la herida los días 0, 7 y 14 y el porcentaje de cierre de la herida el día 14. Los datos son media \pm SEM. *** $P < 0.001$ db/db control frente a grupo control no diabético (db/+). #### $P < 0.001$ db/db tratado con DFX, STEARDA o PALDA frente a db/db control diabético (ANOVA de un factor seguido de la prueba Dunnett).

Para estudiar la reepitelización y la granulación de la herida, realizamos una tinción con H&E. Las capas epiteliales en los ratones tratados con 150 μ M de STEARDA y PALDA presentaron una puntuación de 2.2 en comparación con los ratones db/db no tratados con una puntuación de 0.98. Los ratones tratados con DFX (control positivo) tuvieron una puntuación de 2.97 y los ratones db/+ mostraron una puntuación de 2.8. En cuanto a la granulación, los ratones tratados con 150 μ M de STEARDA y PALDA presentaron una puntuación de 2 y 3, respectivamente, en comparación con los ratones db/db no tratados con una puntuación de 2.98. Los ratones tratados con DFX (control positivo) tuvieron una puntuación de 0.97 y los ratones db/+ mostraron una puntuación de 2.

Para analizar la naturaleza de la curación de las heridas, se evaluó la deposición de colágeno en el sitio de la herida mediante tinción de TM. Los ratones tratados con 150 μ M de STEARDA y PALDA presentaron una puntuación de 3 y 2.75, respectivamente, en comparación con los ratones db/db no tratados con una puntuación de 1.33. Los ratones tratados con DFX tuvieron una puntuación de 4 y los

ratones db/+ mostraron una puntuación de 3.67. Para estudiar la angiogénesis, se realizó una inmunotinción de CD31. Los ratones tratados con 150 μ M de STEARDA y PALDA tuvieron una puntuación de 26 vasos por campo, respectivamente, en comparación con los ratones db/db no tratados con una puntuación de 4 vasos/campo. Los ratones tratados con DFX mostraron una puntuación de 11 vasos por campo y los ratones db/+ presentaron una puntuación de 6 vasos/campo (Figura 20).

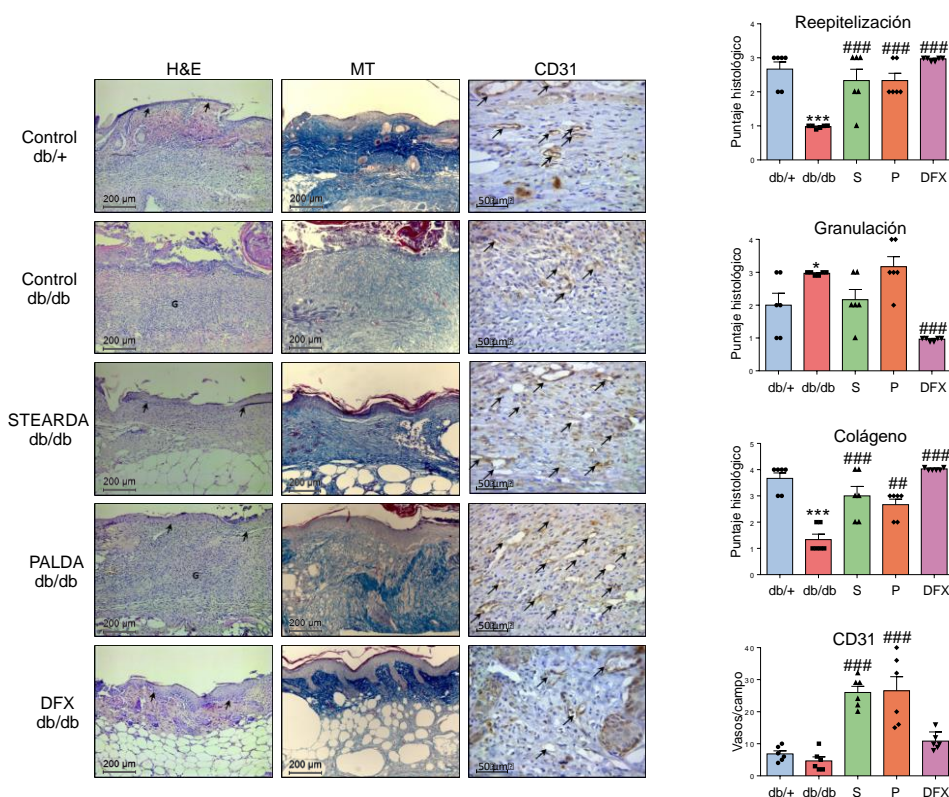


Figura 20. STEARDA y PALDA promueven la cicatrización de heridas en ratones diabéticos tipo 2. Las muestras de tejido se tiñeron con H&E o con MT o con CD31 el día 14, respectivamente. Los criterios para evaluar el puntaje histológico de la cicatrización de heridas fueron los siguientes: reepitelización (1+: pequeña organización epidérmica y dérmica, 2+: organización epidérmica y dérmica moderada, 3+: remodelación completa de la epidermis y dermis), granulación (1+: Capa de granulación delgada, 2+: capa de granulación moderada, 3+: capa de granulación gruesa, 4+: capa de granulación muy gruesa), colágeno [0: ausente, 1: mínimo-GT (tejido de granulación), 2: leve-GT, 3: moderado-GT, 4: marcado-GT], angiogénesis (1+: angiogénesis alterada (1-2 vasos por sitio), 2+: pocos vasos capilares recién formados (3-4 por sitio), 3+: recientemente vasos capilares formados (5-6 por sitio), 4+: vasos capilares recién formados y bien estructurados (más de 7 por sitio)). Las imágenes se cuantificaron utilizando el software ImageJ. Los datos son media \pm SEM. *** $P < 0.001$ db/db sin tratar frente a db/+ control. ## $P < 0.01$ db/db tratado frente a db/db control. #### $P < 0.001$ db / db tratado vs. db/db control. (ANOVA de un factor seguido de la prueba Dunnett).

1.6 La inducción de la vía de respuesta a hipoxia activa varios procesos implicados en la curación de heridas

En base a los experimentos previos, decidimos investigar el efecto de las NADs en los niveles de expresión de proteína y ARNm de proteínas clave en la vía de respuesta a hipoxia en los tejidos de la herida. Como se muestra en la Figura 21, la expresión de la proteína HIF-1 α se inhibió en estos ratones diabéticos en comparación con los ratones db/+. Sin embargo, cuando los ratones db/db se trataron con 150 μ M de STEARDA, PALDA o DFX, esta inhibición se revirtió y la proteína HIF-1 α volvió a los valores normales presentados por los ratones control. Con respecto a las PHDs, ninguna presentó cambios entre ratones db/db tratados y no tratados y los ratones control (Figura 21).

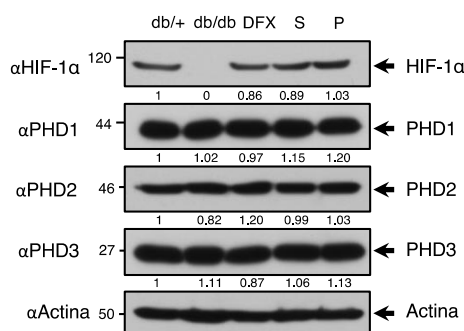


Figura 21. STEARDA y PALDA estabilizan la proteína HIF-1 α . De las heridas extraídas de los ratones mencionados anteriormente, una parte se utilizó para extraer proteínas para analizar los niveles endógenos de las proteínas indicadas mediante inmunotransferencia con el anticuerpo específico. Mostramos un Western Blot representativo de tres experimentos independientes.

Los niveles de expresión de ARNm para HIF-1 α y SIAH2 fueron mayores en los ratones db/db tratados que en aquellos sin tratamiento, alcanzando niveles más altos de estos genes incluso en comparación con los ratones control db/+ (Figura 22). Los niveles de expresión de ARNm en PHD1 presenta una inhibición en ratones db/db no tratados en comparación con los ratones control, y los ratones db/db tratados con STEARDA mostraron una reversión de esta inhibición. Los niveles de expresión de PHD2 y PHD3 en ratones db/db no tratados se encuentran activados en comparación con los ratones db/+. Sin embargo, los ratones db/db tratados tenían niveles de estos genes similares a los presentes en los ratones control (Figura 22).

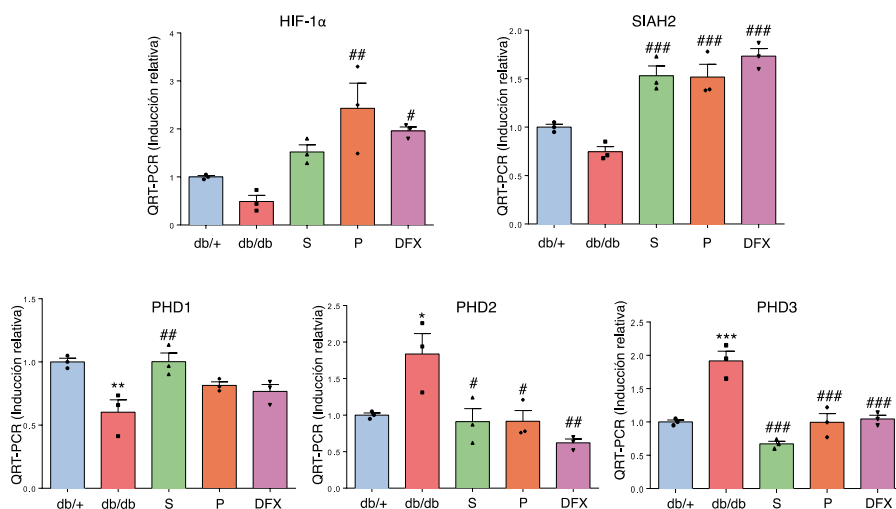


Figura 22. STEARDA y PALDA modifican la vía de respuesta a hipoxia en la cicatrización de heridas. Una parte de las heridas mencionadas anteriormente, se utilizó para analizar por qPCR para medir los niveles de ARNm. Los datos son media \pm SEM de $n = 3$ experimentos. $**P < 0.01$ db/db sin tratar vs. db/+ control. $\#P < 0.05$ db/db tratado frente al db/db sin tratar. $##P < 0.01$ db/db tratado frente al control db/db. $###P < 0.001$ db/db tratado frente al control db/db. (ANOVA de un factor seguido de la prueba Dunnett).

A continuación, decidimos estudiar los genes diana HIF-1 α implicados en la formación de vasos (VEGF-A y SDF-1 α) o en la producción de colágeno (COL1A2). Como se muestra en la Figura 23, los niveles de ARNm de SDF-1 α , VEGF-A y COL1A2 se inhibieron en ratones db/db no tratados, un efecto que se revirtió cuando estos ratones se trataron con STEARDA, PALDA o DFX.

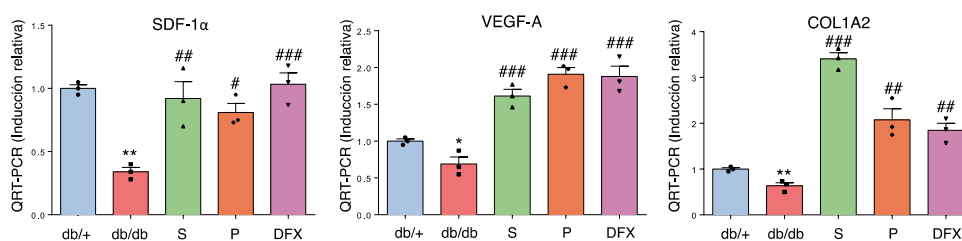


Figura 23. La estabilización de la vía de respuesta a hipoxia activa varios procesos implicados en la cicatrización de heridas. También, se extrajo ARN de estas heridas para estudiar los niveles de ARNm de SDF-1 α , VEGF-A y COL1A2. Los datos son media \pm SEM de $n = 3$ experimentos. $*P < 0.05$ y $**P < 0.01$ db/db control vs. db/+ grupo control. $\#P < 0.05$ db/db tratado frente al control db/db. $##P < 0.01$ db/db tratado frente al control db/db. $###P < 0.001$ db/db tratado frente al control db/db (ANOVA de un factor seguido de la prueba Dunnett).

Finalmente, decidimos analizar los niveles de EPCs (células progenitoras endoteliales) en células mononucleares de sangre periférica aisladas del grupo control (db/+) y ratones diabéticos tipo 2 (db/db), sin tratar o tratados con DFX, STEARDA, PALDA (Figura 24). Los resultados mostraron una disminución del 91% en las EPCs circulantes de ratones diabéticos con respecto al grupo de control (db/+). Este efecto se revirtió parcialmente cuando los ratones diabéticos se trataron con STEARDA, PALDA o DFX (control positivo).

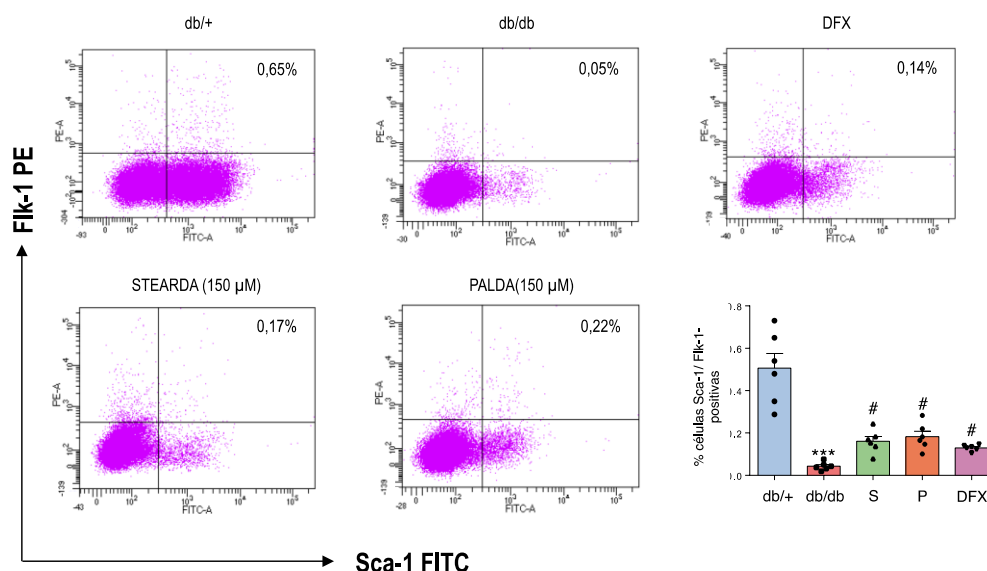


Figura 24. STEARDA y PALDA movilizan EPCs circulantes en ratones diabéticos. Histogramas representativos del análisis Sca-1/Flk-1 para EPCs del grupo control (db/+), ratones diabéticos no tratados (db/db) y ratones diabéticos (db/db) tratados con DFX (1 mM), STEARDA (150 μM), PALDA (150 μM). Los ratones db/db diabéticos tipo 2 presentaron una disminución de las EPCs circulantes en comparación con los ratones normales (db/+). *** $P < 0.001$ db/db sin tratar frente a db/+ grupo control. # $P < 0.05$ db/db tratado frente al control db/db (ANOVA de un factor seguido de la prueba Dunnett).

2. Perfil metabólico de tejido tumoral de cáncer de pulmón humano: metabolismo de nucleótidos como candidato para intervenciones terapéuticas y biomarcadores.

2.1 Perfil metabólico de los tejidos pulmonares

El presente estudio se realizó con el objetivo de comparar los perfiles bioquímicos del tejido normal y tumoral de cáncer de pulmón del mismo paciente, de modo que gracias a las diferencias en la firma metabólica se puedan identificar nuevas vías para la intervención terapéutica. Se seleccionaron un total de 136 muestras de tejido pulmonar, que fueron revisadas histológicamente y clasificadas como Adenocarcinoma (AC) (n = 33) o Carcinoma de células escamosas (SCC) (n = 35), junto con sus muestras correspondientes de tejido pulmonar normal adyacente del mismo paciente. Las características clinicopatológicas de toda la cohorte de pacientes se resumen en la Tabla 3.

Variables	Adenocarcinoma (n=33)	Epidermoide (n=35)	P
Edad (Media)	62.11±9.73	68.71±7.46	0.002
Género			
Hombre	24	35	0.032
Mujer	9	0	
Comorbilidades	26	33	0.018
Neoplasias	8	2	0.54
Metástasis en el seguimiento	3	2	0.005
Tamaño tumor	3.52±1.98	4.5±2.01	0.039
SUV(max)* tumor	11.07±8.19	13.4±5.73	0.15
pTNM			
IA	10	5	0.38
IB	7	12	
IIA	6	7	
IIB	4	6	
IIIA	5	5	
IIIB	1	0	
Grado Diferenciación			
I	4	2	0.11
II	16	16	

Tabla 3. Características de los pacientes

Se determinaron los perfiles bioquímicos globales del tejido pulmonar sano/tumoral emparejado de los mismos pacientes. Se detectaron un total de 851 compuestos cuya identidad se conoce mediante metabolómica en ambos subtipos histológicos, la cual proporciona una instantánea completa del estado metabólico de los tejidos de pulmón. El análisis no supervisado por PCA aplicado al conjunto completo de datos reveló un claro patrón de discriminación para ambos subtipos histológicos, AC y SCC, versus tejido pulmonar normal como se muestra en la Figura 25.

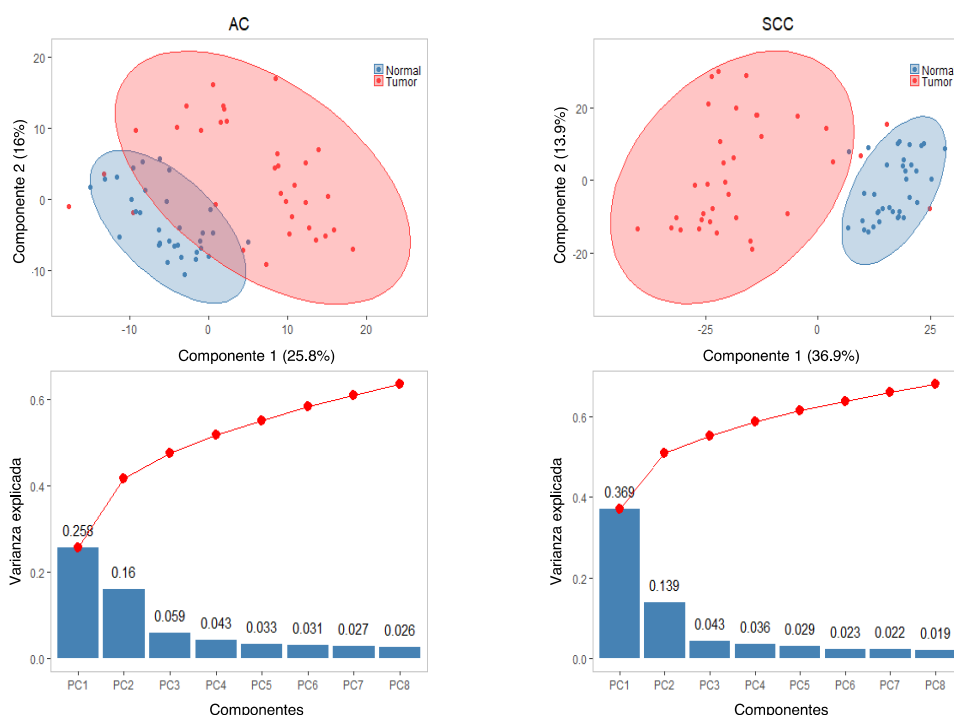


Figura 25. Diagramas PCA y componentes principales en ambos subtipos histológicos. Diagramas PCA proporcionados por el conjunto completo de datos que muestran patrones de discriminación entre tejido pulmonar adenocarcinoma (AC) versus tejido control y tejido de carcinoma escamoso de pulmón (SCC) versus tejido control. También se ilustra la contribución de los componentes principales (PC) para explicar la variabilidad observada y la contribución acumulativa.

Esta discriminación fue apoyada en cambios metabólicos críticos que ocurren en tejidos pulmonares. De hecho, identificamos un total de 280 compuestos en AC y 623 en SCC con diferencias significativas de concentración entre los grupos experimentales, con un total de 237 metabolitos comunes para ambos.

De acuerdo a los resultados, analizamos los diferentes perfiles metabólicos obtenidos de los tejidos normales y tumorales (AC y SCC) mediante su visualización en mapas de calor, donde los datos fueron normalizados y priorizados en diferentes vías metabólicas, y ordenados según las expresiones diferenciales entre tumor y sano. Como se muestra en la Figura 26, los resultados obtenidos dividen las muestras de tejido normal de las tumorales en dos grupos claramente diferentes en casi todos los casos. Aunque existen diferencias entre AC y SCC en la jerarquía de las vías metabólicas, las más alteradas en el tejido tumoral son las relacionadas con péptidos, nucleótidos, aminoácidos y lípidos.

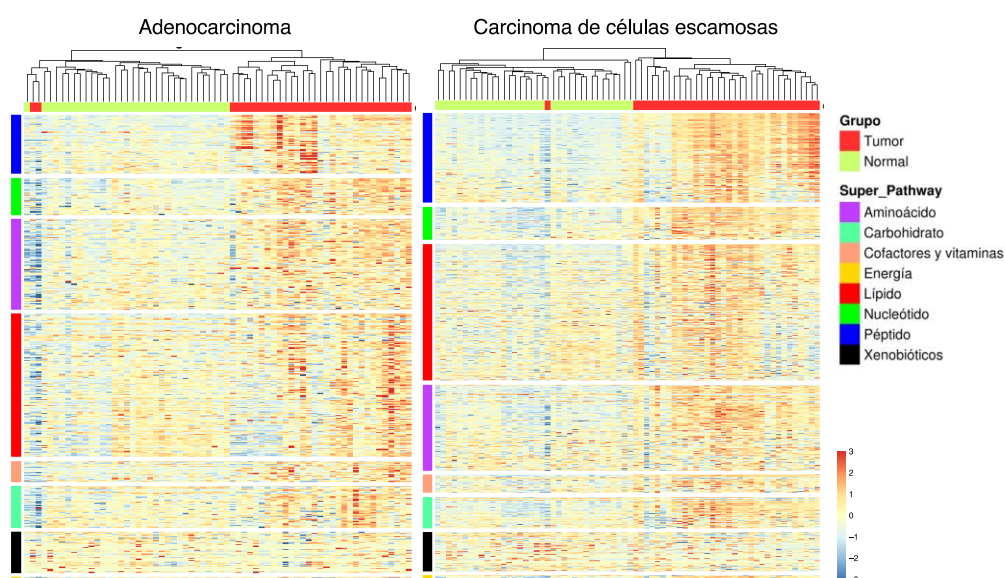


Figura 26. Representación de mapa de calor de los niveles bioquímicos obtenidos de cada ensayo metabolómico. Los valores se escalan utilizando el Z-Score. El orden del eje Y (metabolito) refleja la diferencia estadística entre el tejido tumoral y el normal a nivel de vía y metabolito. El orden del eje X (muestra) se establece después de aplicar un algoritmo de agrupamiento jerárquico, usando UPGMA como método y 1-Correlación de Pearson como métrica.

A continuación, analizamos de forma similar los cambios de expresión encontrados entre las mismas muestras de pacientes (tumor versus sano) en la lista de metabolitos comunes de ambas patologías. Como se muestra en la Figura 27, aunque no se detectan diferencias importantes entre ambas patologías, existe un aumento especialmente significativo en los niveles de inducción de metabolitos relacionados con péptidos y aminoácidos en el caso de SCC.

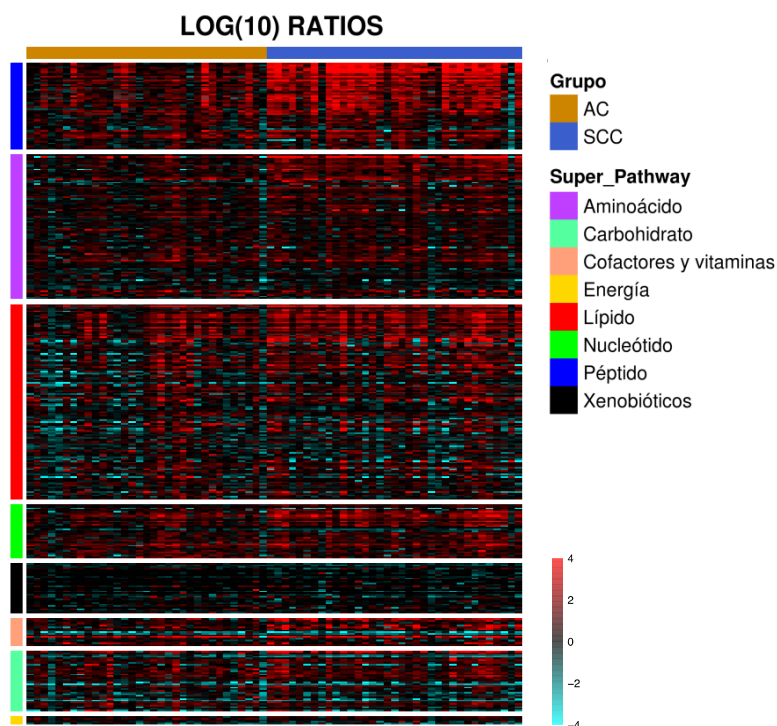


Figura 27. Representación de mapa de calor de los niveles bioquímicos obtenidos de cada ensayo metabolómico. En esta figura se muestra el logaritmo transformado de las relaciones tejido tumor/normal (logFC) ordenadas por diferencia estadística a nivel de vía y metabolito.

En conjunto, estos datos muestran la existencia de una clara alteración metabólica en el tejido pulmonar tumoral en relación con el tejido sano correspondiente en cada paciente. Además, indican la existencia de claras diferencias no solo entre las diferentes vías metabólicas, sino también inherentemente intrínsecas a ambas patologías.

2.2 Metabolismo de la glucosa en el cáncer de pulmón

A continuación, se realizó un análisis detallado de los metabolitos más relevantes los cuales muestran jerárquicamente cambios significativos en las vías más importantes. Como se muestra en la Figura 28, detectamos una disminución significativa en los niveles de varios compuestos implicados en la glucólisis en ambos subtipos de tumores, como son la glucosa, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato y el fosfoenolpiruvato, que también estuvieron acompañados por una acumulación

significativa de los productos finales de la glucólisis, como son el lactato y el piruvato (al menos en SCC). También fue evidente un aumento en los metabolitos de la ruta de la pentosa fosfato, incluyendo ribosa, xilulosa 5-fosfato, sedoheptulosa-7-fosfato y ribosa 5-fosfato, así como el sorbitol y la fructosa. Con respecto a los metabolitos de la ruta del ácido tricarboxílico, observamos un aumento en varios compuestos intermedios, así como el fumarato, el malato en ambos subtipos de tumores y el oxalacetato en SCC. En el mismo sentido, encontramos otros cambios que sugieren un aumento en el uso de glucosa en ambos o en solo uno de los subtipos celulares, un aumento significativo en los niveles de alcoholes en azúcares ácidos (ribulosa, ribosa, ribitol, ribonato, xilulosa, xilonato, xilitol y arabitol) y amino azúcares (N-acetilglucosamina, N-acetilglucosamina 6-fosfato, N-acetilgalactosamina, N-acetilmanosamina y N-acetilneuraminato).

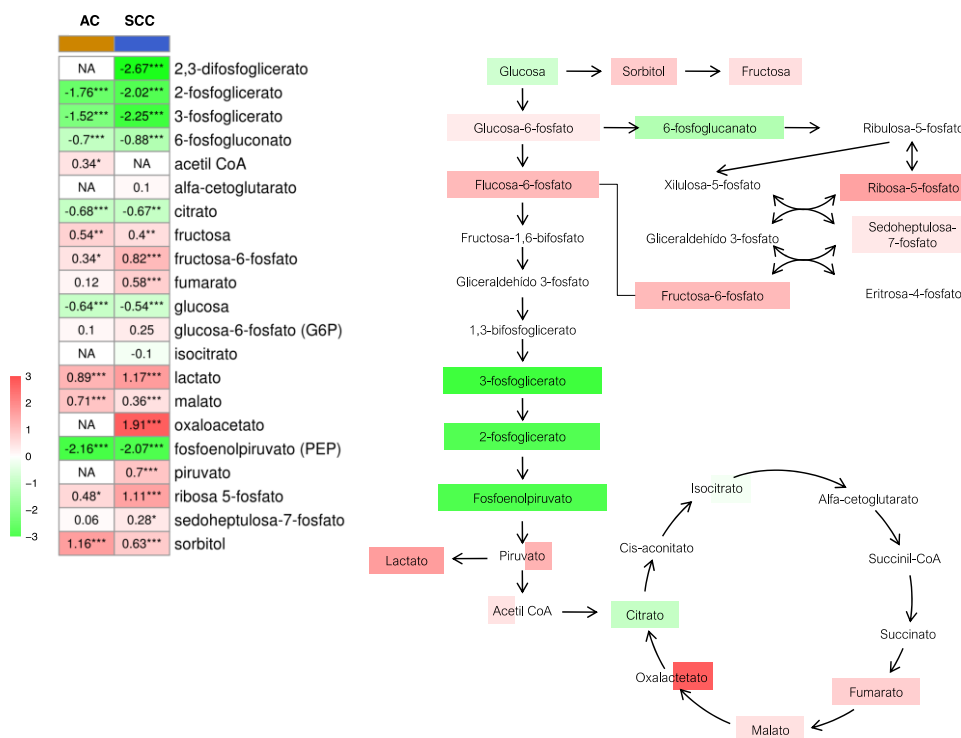


Figura 28. Vía metabólica de la glucosa. El mapa de calor muestra la media de las proporciones tumor/normal transformadas logarítmicamente para los metabolitos en adenocarcinoma (naranja) y cáncer de células escamosas (azul). Los colores rojo y verde indican aumento o disminución del nivel de metabolitos, respectivamente.

2.3 Niveles de glutatión y otros marcadores de estrés oxidativo

El glutatión desempeña un papel determinante en la defensa antioxidante, homeostasis redox y desintoxicación de toxinas (Jozefczak *et al*, 2012; Makarov *et al*, 2006). Los resultados obtenidos muestran un aumento en los niveles de metionina sulfóxido (MetO) en ambos subtipos tumorales en comparación con el tejido sano, junto con el glutatión reducido. De manera similar, detectamos un aumento en cistationina, cisteína y glicina, que son componentes limitantes de la síntesis de glutatión (Figura 29). Por el contrario, existen diferencias entre AC y SCC puesto que existen cambios tanto de los niveles de glutatión oxidado como de los niveles de cisteína-glicina. Los cambios detectados en los niveles de γ -glutamyl-aa sugieren una alteración en los niveles de glutatión. Por lo tanto, observamos un aumento en los niveles de γ -glutamyl isoleucina en ambos subtipos de tumores, y en el resto de aminoácidos de esta familia, especialmente en el tejido de SCC. Del mismo modo, las muestras tumorales en comparación con las muestras sanas mostraron altos niveles de antioxidantes, como ascorbato y α/γ -tocoferol. En total, estos hallazgos muestran una acumulación de marcadores de estrés oxidativo y antioxidantes.

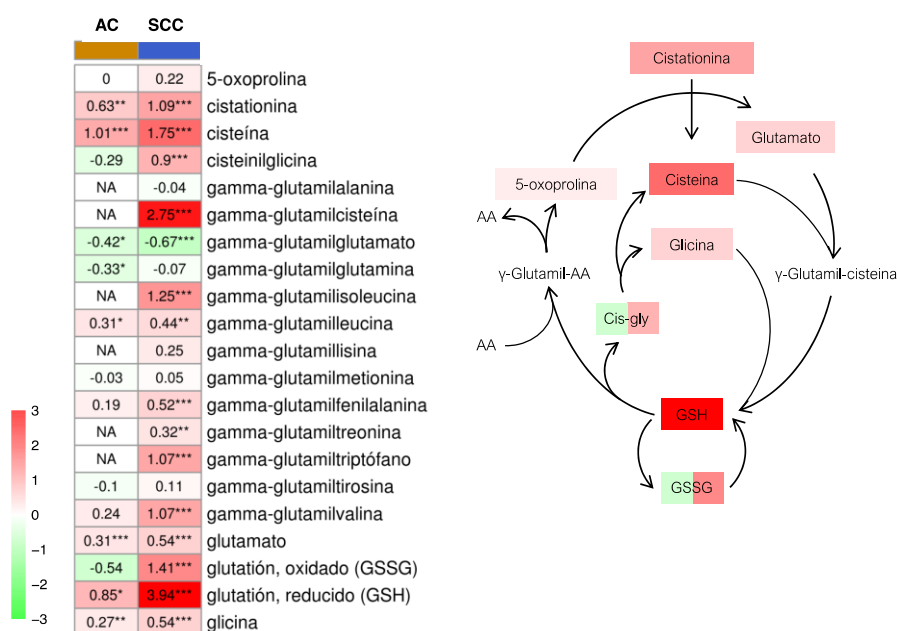


Figura 29. Vía metabólica del glutatión. El mapa de calor muestra la media de las proporciones tumor/normal transformadas logarítmicamente para metabolitos en adenocarcinoma (naranja) y cáncer de células escamosas (azul). Los colores rojo y verde indican aumento o disminución del nivel de metabolitos, respectivamente.

2.4 Metabolismo de arginina y poliaminas

El metabolismo de la arginina tiene un papel importante en la remodelación de la matriz extracelular y la producción de poliaminas, creatina y óxido nítrico (Rath *et al*, 2014) (Wu *et al*, 2009). Como se muestra en la Figura 30, observamos una ligera disminución en los niveles de arginina, ornitina y citrulina, así como el aspartato en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano. Por el contrario, los tejidos tumorales mostraron niveles elevados de las poliaminas, como putrescina, espermina y espermidina, así como numerosas moléculas relacionadas con éstas, como N-acetilputrescina y 5-metiltoadenosina (MTA). En cuanto a los marcadores de remodelación de la matriz extracelular, encontramos un aumento en prolina, trans-4-hidroxiprolina y pro-hidroxi-pro, así como en dimetilarginina asimétrica (ADMA) en las muestras tumorales en comparación con el tejido sano.

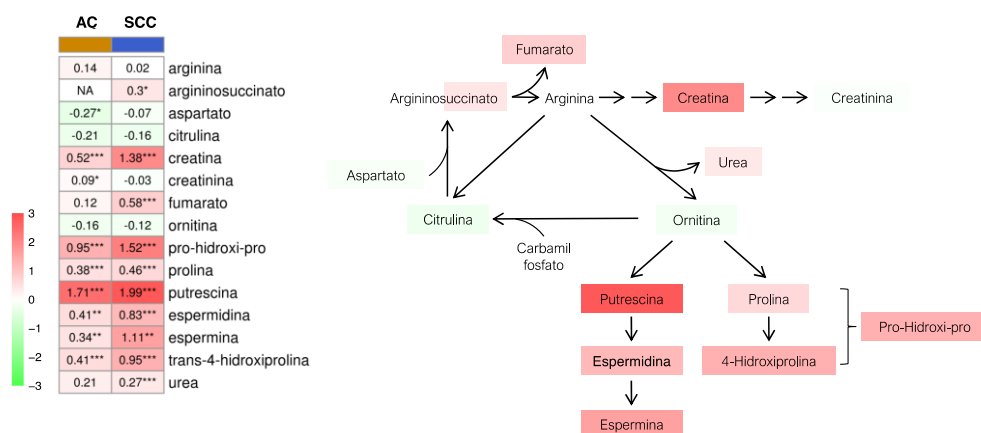


Figura 30. Vía metabólica de la arginina y la poliamina. El mapa de calor muestra la media de las proporciones tumor/normal transformadas logarítmicamente para metabolitos en adenocarcinoma (naranja) y cáncer de células escamosas (azul). Los colores rojo y verde indican aumento o disminución del nivel de metabolitos, respectivamente.

2.5 Metabolismo de ácidos grasos y mediadores lipídicos

Los ácidos grasos son una valiosa fuente de energía para la oxidación mitocondrial y la generación de células ATP (Lehner & Quiroga, 2016). El perfil metabolómico de los tejidos tumorales mostró un claro aumento en los monoacilglicerol y glicerol, así como niveles elevados de ácidos grasos de cadena media y larga que incluyen palmitato, palmitoleato, estearato, eicosenoato y erucato

(Figura 31). Además, múltiples metabolitos de los fosfolípidos, incluyendo fosfato de colina, fosfoetanolamina, citidina 5'-difosfocolina, glicerofosforilcolina (GPC) y glicerol 3-fosfato (G3P), también se elevaron en el tejido tumoral. Observamos un aumento significativo en los niveles de ácidos grasos esenciales como el dihomo-linolenato y el araquidonato. Por el contrario, citrato, carnitina y lípidos conjugados con carnitina, como son propionilcarnitina, octanoilcarnitina y laurilcarnitina fueron significativamente menores en el tejido pulmonar canceroso. También hubo un ligero, pero no significativo aumento en el cuerpo cetónico 3-hidroxibutirato (BHBA) en las muestras tumorales que podría sugerir un nivel elevado de oxidación de ácidos grasos. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la oxidación de lípidos puede alterarse en el tejido pulmonar del tumor.

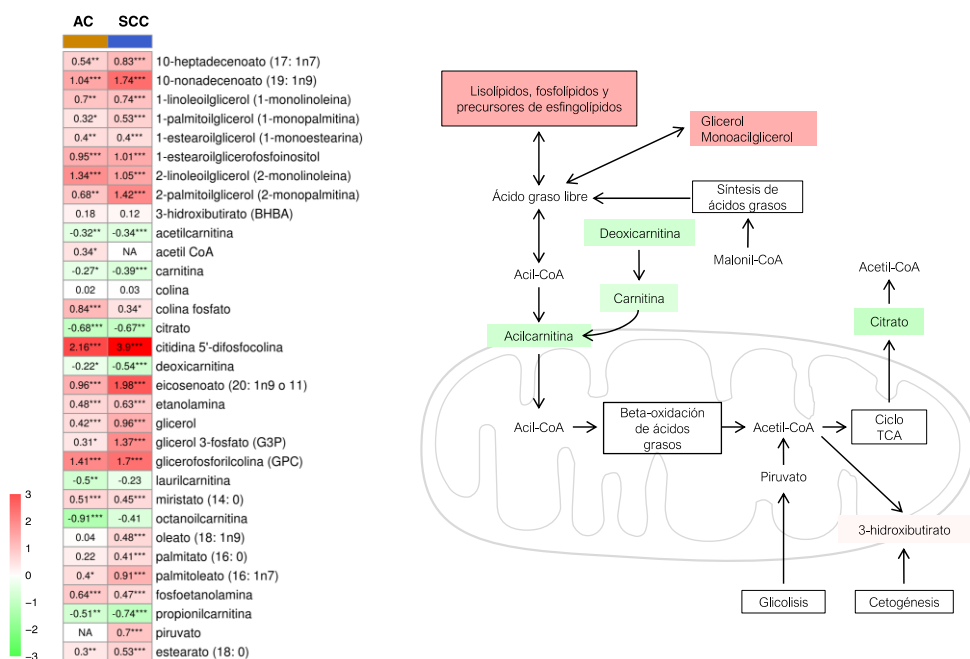


Figura 31. Vía metabólica de ácidos grasos y mediadores lipídicos. El mapa de calor muestra la media de las proporciones tumor/normal transformadas logarítmicamente para metabolitos en adenocarcinoma (naranja) y cáncer de células escamosas (azul). Los colores rojo y verde indican aumento o disminución del nivel de metabolitos, respectivamente.

2.6 Metabolismo del carbono

Existen estudios previos que han asociado el metabolismo del carbono con la carcinogénesis, principalmente debido a su papel en la síntesis de ADN (Shuvalov *et al*, 2017; Song *et al*, 2016). En este sentido, nuestros datos muestran una importante acumulación de metabolitos implicados en esta vía en los tejidos tumorales en comparación con el tejido normal. Como se muestra en la Figura 32, hemos detectado un aumento en los niveles de glicina, sarcosina, S-adenosilhomocisteína (SAH), metionina, homocisteína y 5-metil-tetrahidrofolato (THF). Por el contrario, se observó una disminución en los niveles de betaina y ornitina. Estos cambios también fueron acompañados por un aumento en los niveles de 5-metiltetrahidrofolato, así como en el número de metabolitos relacionados con el metabolismo de riboflavina (dinucleótido de flavina y adenina (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y riboflavina (Vitamin B2) en ambos subtipos de tumores.

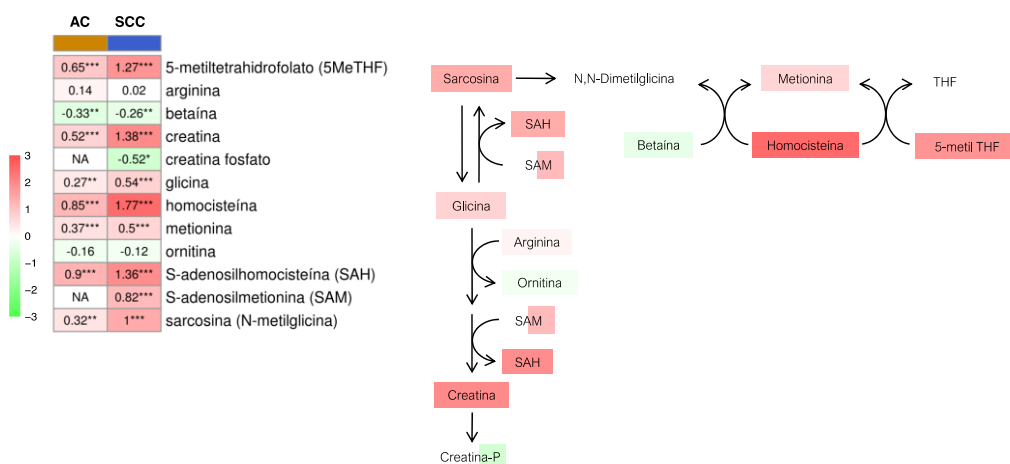


Figura 32. Vía metabólica del carbono. El mapa de calor muestra la media de las proporciones tumor/normal transformadas logarítmicamente para metabolitos en adenocarcinoma (naranja) y cáncer de células escamosas (azul). Los colores rojo y verde indican aumento o disminución del nivel de metabolitos, respectivamente.

2.7 Catabolismo de nucleótidos

Como se explicó anteriormente en la Figura 28, observamos un aumento significativo en los niveles de ribosa-5-fosfato en el tejido tumoral de ambos subtipos histológicos, el sustrato inicial en la ruta de la purina. Un análisis detallado de esta vía también muestra un aumento significativo en los primeros productos de esta vía, como AMP (Adenosina 5-Monofosfato) e IMP (Inosina 5-Monofosfato) (Figura 33). Además, detectamos la acumulación de múltiples productos del catabolismo de la purina, como la inosina, la hipoxantina, la xantina y la xantosina, así como la adenosina, la adenina y la guanosina. Por el contrario, se encontró cambios significativos en la expresión de xantosina 5'-monofosfato (XMP) solo en SCC, así como una disminución en los niveles de guanina. También detectamos ligeros cambios en la expresión de urato, especialmente en AC, como resultado de la degradación del metabolismo de la purina. Del mismo modo, se detectaron alteraciones en la ruta de las pirimidinas. Se detectaron altos niveles de citidina-3' y 5'-monofosfato (CMP) en el tejido tumoral, así como en los metabolitos de pirimidina, uridina y citidina, que se acompañaron de niveles significativamente elevados de los catabolitos uracilo, dihidrouracilo y beta-alanina.

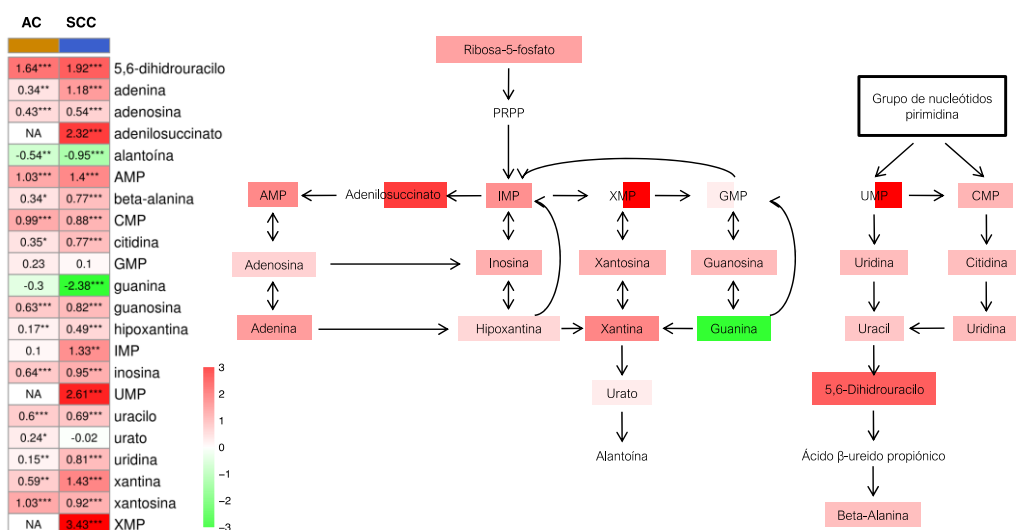


Figura 33. Vía metabólica de nucleótidos. El mapa de calor muestra la media de las proporciones tumor/normal transformadas logarítmicamente para metabolitos en adenocarcinoma (naranja) y cáncer de células escamosas (azul). Los colores rojo y verde indican aumento o disminución del nivel de metabolitos, respectivamente.

2.8 Análisis del perfil de expresión génica en el metabolismo de las purinas.

Expresión histológica de ATIC y ADSL

Como mostramos más arriba en la Figura 26, las vías metabólicas más alteradas en ambos subtipos histológicos fueron las relacionadas con péptidos y nucleótidos. Esta diferencia estadística entre los niveles de metabolitos en tejidos tumorales y normales, junto con la clara relevancia del metabolismo de nucleótidos en el desarrollo de tumorigénesis, nos llevó a analizar esta vía con más detalle. Por lo tanto, la primera evaluación consistió en un análisis no supervisado por PCA para buscar patrones de discriminación utilizando metabolitos incluidos en la ruta metabólica de nucleótidos para AC y SCC frente a tejido normal (Figura 34). La discriminación más clara en el metabolismo de los nucleótidos fue la encontrada entre el SCC y los tejidos normales. Sin embargo, también se observaron tendencias de discriminación entre los tejidos AC y normales y entre los tejidos AC y SCC.

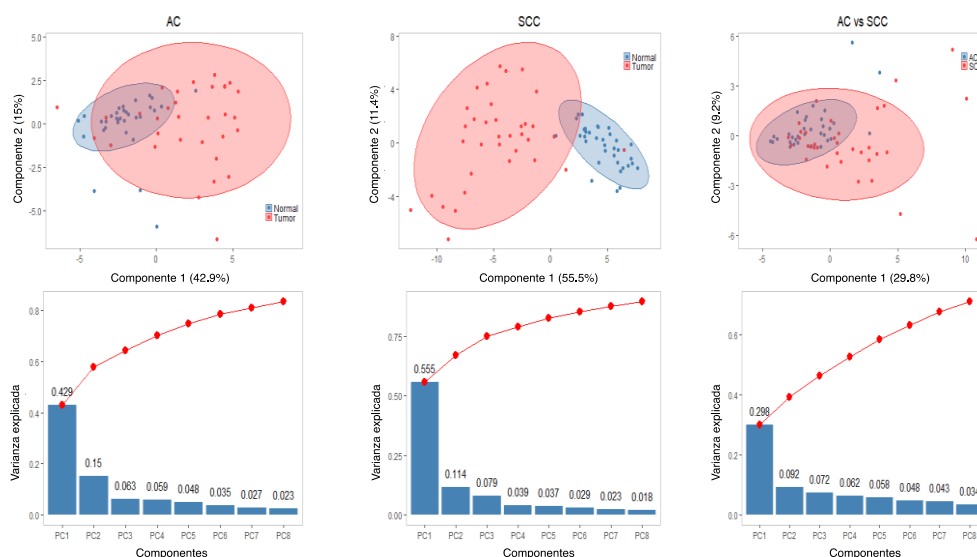


Figura 34. Diagramas PCA y componentes principales en AC y SCC. Gráficos PCA proporcionados por un conjunto de datos de purinas que muestran patrones de discriminación entre tejido pulmonar adenocarcinoma (AC) versus control, tejido de carcinoma de pulmón escamoso (SCC) versus control y tejido pulmonar AC frente a SCC, este último obtenido considerando el valor de veces de inducción de cada metabolito entre tejido normal y canceroso para comparar ambos tipos de carcinomas. También se ilustra la contribución de los componentes principales (PC) para explicar la variabilidad observada y la contribución acumulativa.

El mismo escenario fue encontrado por PLS-DA como se ve en la Figura 35, que muestra un claro efecto de discriminación tanto en AC como en SCC frente al tejido normal al considerar metabolitos alterados.

La relevancia del metabolismo de nucleótidos en el desarrollo de la tumorigénesis, junto con la importancia de la expresión diferencial de sus metabolitos detectados en ambos subtipos tumorales nos llevó a analizar la alteración de esta vía metabólica con más detalle. Por lo tanto, la primera evaluación consistió en un análisis supervisado por PLS-DA para AC y SCC frente al tejido normal. La Figura 35 muestra una clara discriminación entre AC o SCC frente al tejido normal al considerar la presencia de metabolitos alterados. Como se puede observar, el porcentaje de variabilidad fue superior al 50% en ambos casos, lo cual es representativo.

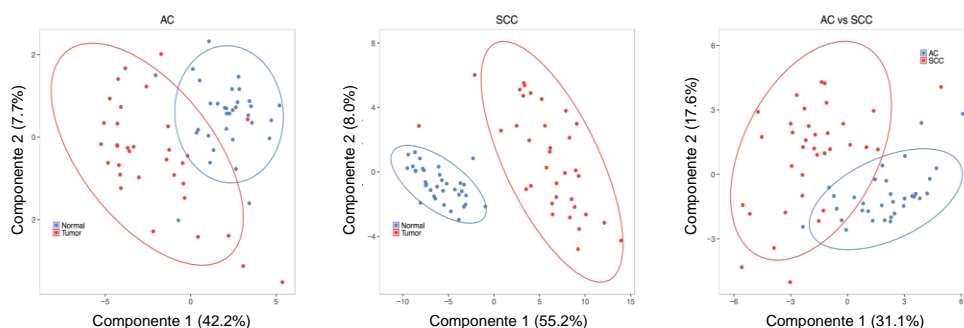


Figura 35. PLS-DA obtenido para tejidos AC y SCC utilizando nucleótidos y metabolitos significativos entre tejido normal y canceroso. Los conjuntos de datos incluyeron aquellos metabolitos que fueron estadísticamente significativos en AC y SCC frente a tejido normal, 37 y 61 compuestos para AC y SCC, respectivamente. El tercer PLS-DA se obtuvo utilizando el valor de cambio de pliegue de cada metabolito entre tejido normal y canceroso para comparar ambos tipos de carcinomas. Para este propósito, consideramos solo aquellos metabolitos que fueron comúnmente alterados en casos de AC y SCC frente al tejido normal, 34 compuestos.

Se realizó un análisis adicional considerando solo los metabolitos que se alteraron comúnmente en AC y SCC para estudiar la existencia de patrones de discriminación, que muestran la existencia de diferencias en los niveles de metabolitos. Los parámetros de precisión, R2 y Q2 para los tres modelos PLS-DA, detallados en la Figura 36, proporcionan una descripción general de su discriminación.

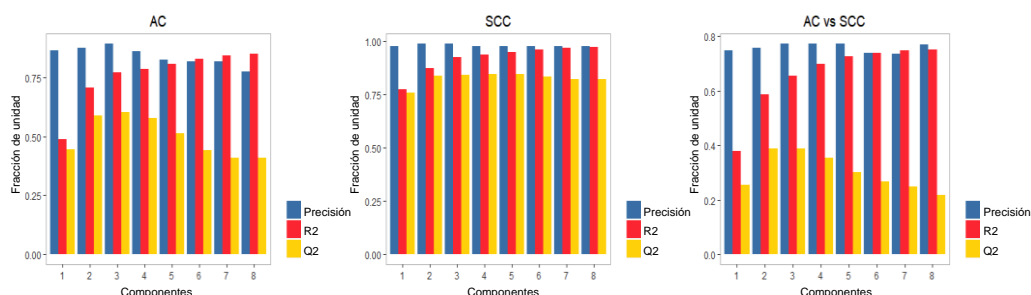


Figura 36. Indicadores de rendimiento. Estos son expresados en términos de precisión, bondad de ajuste (R2) y predicción (Q2) para la combinación de componentes para los tres modelos PLS-DA que discriminan tejido pulmonar adenocarcinoma (AC) versus control, tejido de carcinoma escamoso de pulmón (SCC) versus control tejido y tejidos de pulmón AC versus SCC.

El gráfico PLS-DA también reveló la existencia de diferencias en los niveles de metabolitos en los casos de AC versus SCC. El análisis Random Forest adicional proporcionó los 10 principales metabolitos con el mayor poder de discriminación para los tejidos AC y SCC en comparación con los tejidos normales correspondientes (Figura 37). 5,6-dihidrouracilo e inosina fueron los dos metabolitos con mayor capacidad de discriminación para AC, mientras que 2'-O-metilguanosa y 5-metiluridina lo fueron para SCC.

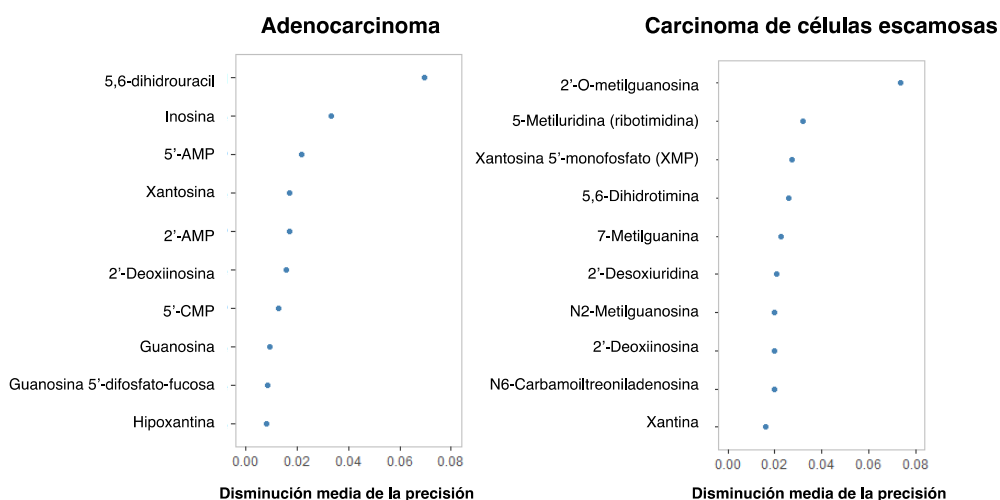


Figura 37. PLS-DA obtenido para tejidos AC y SCC utilizando nucleótidos y metabolitos significativos entre tejido normal y canceroso. Los diez principales nucleótidos y derivados se clasificaron según su capacidad de discriminación (expresada como precisión de disminución media) proporcionada por el análisis de Random Forest para los casos de AC y SCC.

A continuación, decidimos analizar la capacidad predictiva de los 5 mejores metabolitos con fines de diagnóstico. La Figura 38 muestra los diagramas de caja y las curvas ROC obtenidas para cada compuesto para los casos de AC y SCC.

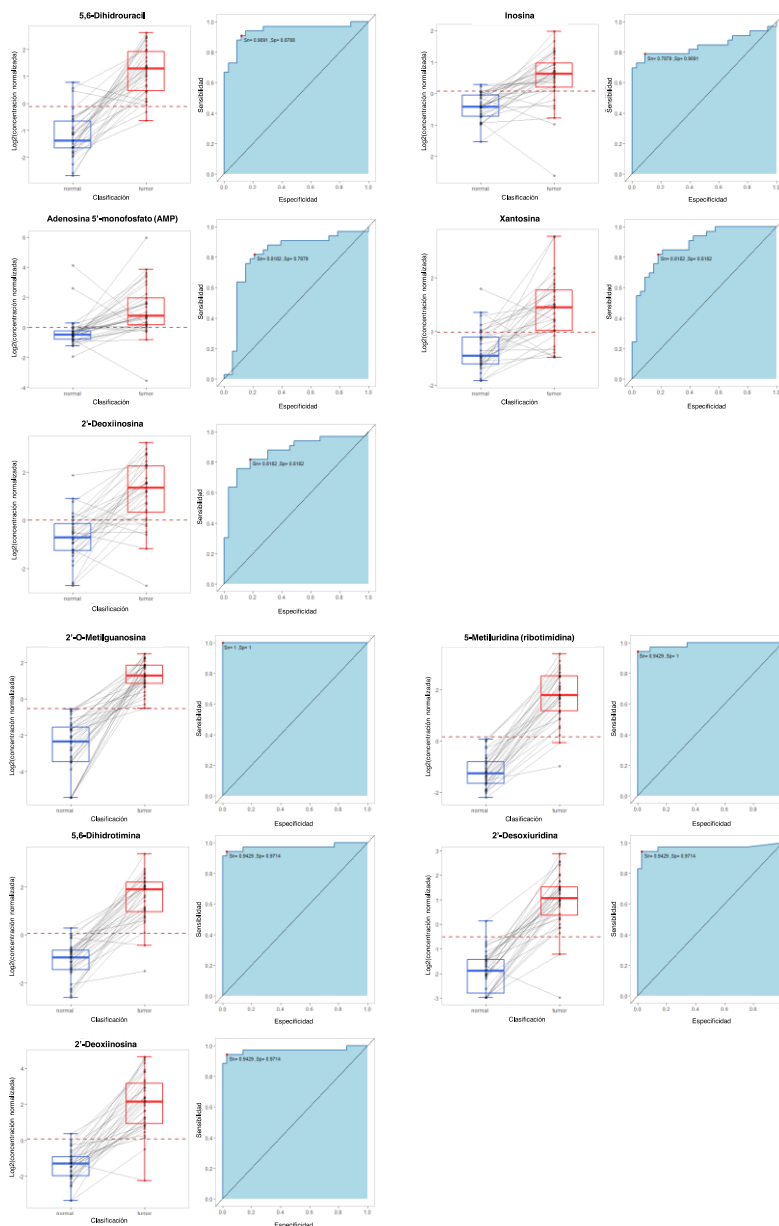


Figura 38. Diagramas de caja y curvas ROC. Éstas se obtuvieron para los cinco nucleótidos y metabolitos superiores para discriminar entre tejido normal y canceroso de acuerdo con el análisis Random Forest para AC (A) y SCC (B). También se muestra el área bajo la curva (AUC), así como la sensibilidad y especificidad para el umbral que proporciona la mayor precisión.

Finalmente, decidimos estudiar en ambos subtipos histológicos las enzimas más relevantes involucradas en la regulación del catabolismo de las purinas, seleccionando las 10 mejores según su rol en la vía (Figura 39).

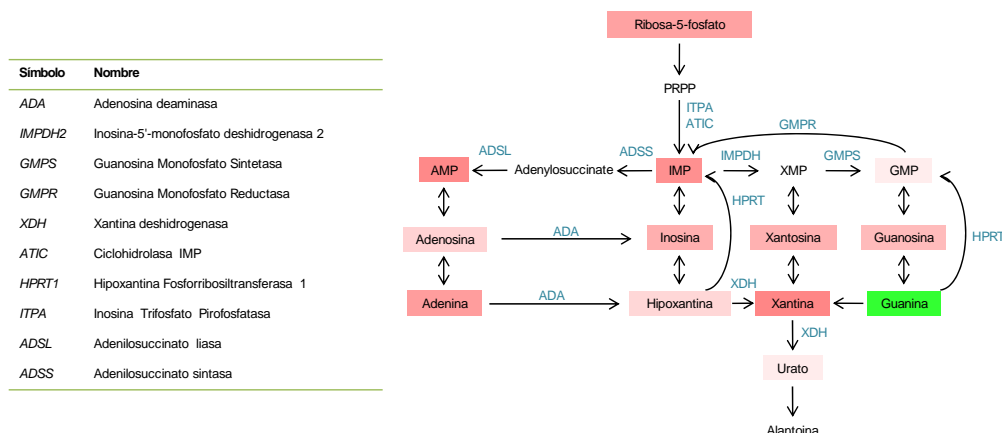


Figura 39. Enzimas analizadas implicadas en la ruta del metabolismo de nucleótidos. Se muestran las enzimas más importantes en el catabolismo de las purinas.

Como se muestra en la Figura 40A, encontramos cambios significativos en la expresión génica de 6 enzimas, 4 de las cuales presentaron diferentes patrones de expresión en ambos subtipos histológicos. Debido a la importancia del purinosoma como una posible nueva diana terapéutica en el tratamiento del cáncer de pulmón (Jackson et al., 2013), decidimos estudiar de cerca el análisis de ATIC (Ciclohidrolasa IMP) y ADSL (Adenylosuccinato liasa). Primero, los análisis de los datos disponibles en The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA, $n = 230$ para AC y $n = 179$ para SCC) revelaron que el 4% de los casos de SCC humanos y el 2.6% de los casos de AC presentan alteraciones genéticas en ATIC, que están asociados con la delección y la desregulación del ARNm en SCC y la amplificación y un aumento de regulación del ARNm en AC. De manera similar, en el caso de ADSL, el 11% de los casos de SCC humanos y el 3% de los casos de AC presentan alteraciones genéticas, generalmente un aumento en la regulación del mRNA (Figura 40B). Estos resultados son similares a los obtenidos con nuestra serie de datos, excepto en el caso de la expresión de ATIC en SCC, que muestra una tendencia diferente y puede deberse a las diferencias en el número de casos.

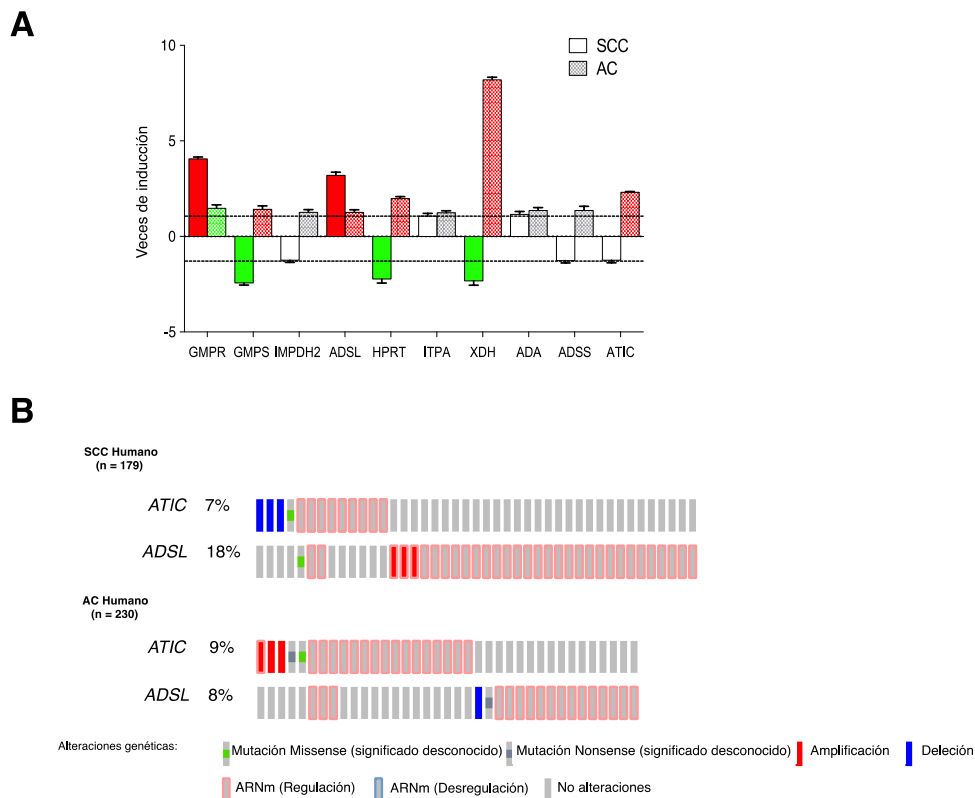


Figura 40. Metabolismo de las purinas y expresión de ATIC y ADSL. (A) Se extrajo el ARN total de los tejidos de AC y SCC, se evaluó la integridad y se modificaron los genes indicados en las muestras tumorales en comparación con muestras sanas del pulmón del mismo paciente analizadas mediante qPCR las cuales son expresadas como veces de inducción. Las eficiencias de amplificación se validaron y normalizaron frente a β -actina T, y las veces de inducción en la expresión génica se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados representan la media \pm SD. (B) Alteraciones genéticas en los genes ADSL y ATIC en muestras humanas de AC y SCC. Los datos de TCGA se analizaron utilizando el software cBioportal. Cada columna representa a un paciente y muestra solo el porcentaje de casos alterados.

El análisis de la expresión de la proteína ATIC y ADSL a través de inmunohistoquímica (Figura 41A y B) mostró una expresión más intensa de estas proteínas en comparación con el tejido sano para los casos de AC y SCC.

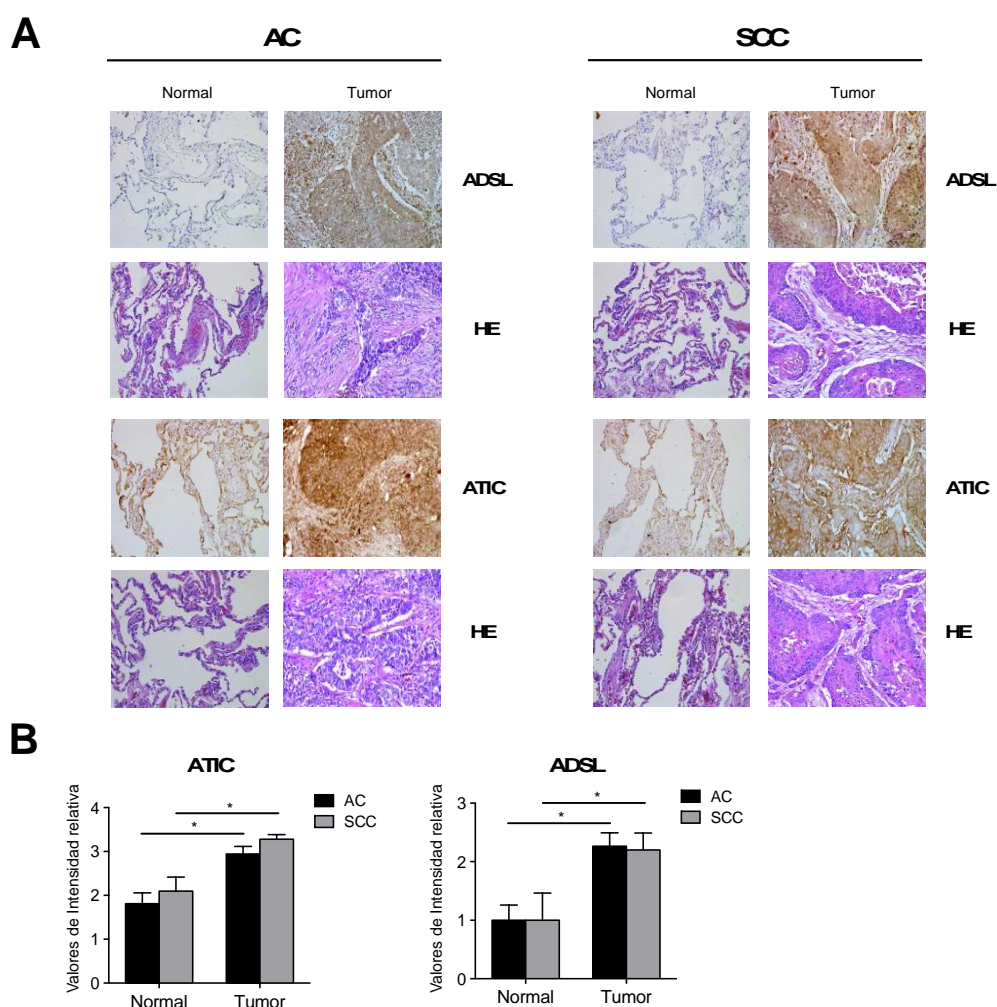


Figura 41. Inmunohistoquímica para ATIC y ADSL. (A) Expresión de ADSL y ATIC en AC y SCC analizados por inmunohistoquímica. Imágenes representativas de tumor pulmonar y tejido normal adyacente teñido con ADSL o anticuerpo ATIC (x20) y hematoxilina-eosina (HE) (x20). **(B)** expresión de ATIC y ASDL en AC y SCC en comparación con tejido sano circundante. La expresión se cuantificó como se detalla en los materiales y métodos. Los resultados se expresan como valores de intensidad relativa y representan la media \pm SD. * Valor $P < 0.05$.

Finalmente, analizamos la expresión ATIC o ADSL estudiando la supervivencia general y sin recaída en ambos subtipos histológicos disponibles de TCGA y varios estudios GEO ($n = 724$ para AC y $n = 524$ para SCC). Como se muestra en la Figura 42, en todos los casos hay una clara relación significativa entre la supervivencia y la expresión de ATIC o ADSL. Además, es especialmente interesante en el caso de la

expresión de ADSL, donde la asociación a la supervivencia es opuesta dependiendo de los subtipos histológicos analizados.

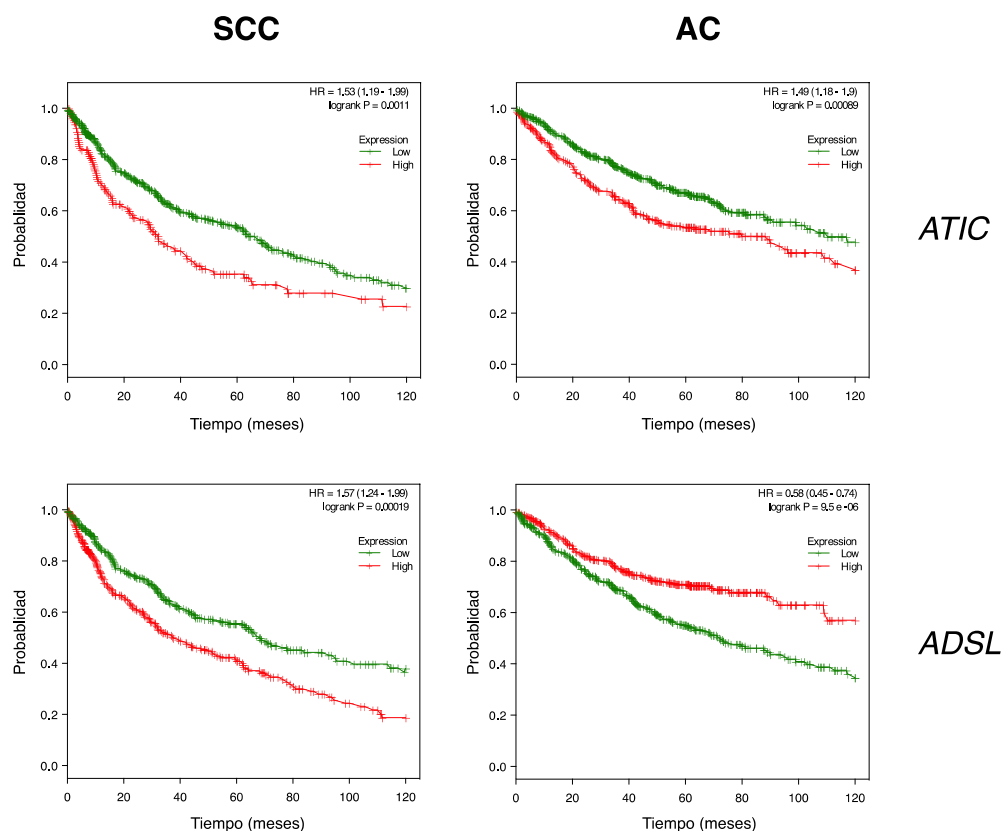


Figura 42. Asociación entre la expresión del gen ADSL/ATIC y la supervivencia en cohortes de pacientes con cáncer de pulmón. Gráficos de Kaplan-Meier para la expresión génica de ADSL y ATIC (niveles altos y bajos) en cohortes de cáncer de pulmón se encuentran disponibles en KM plotter ($n = 724$ para AC y $n = 524$ para SCC). Se muestran los valores p de log-Rank y los cocientes de riesgos (HR, intervalo de confianza del 95% entre paréntesis). El valor de p representa la igualdad de las curvas de supervivencia basadas en un test de log-Rank.

Discusión

VII. DISCUSIÓN

1. Efecto de las *N*-acil-dopaminas sobre la diferenciación de células beta y la cicatrización de heridas en ratones diabéticos

La ruta de respuesta a hipoxia está implicada en la fisiopatología de diversas enfermedades, como el síndrome metabólico, el cáncer, las enfermedades vasculares pulmonares, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Gladek *et al*, 2017; Rausch *et al*, 2017; Semenza, 2001). La diabetes se ha convertido en la enfermedad crónica más común y en una de las principales causas de muerte en la mayoría de los países desarrollados. Trabajos anteriores han demostrado que la desregulación de la vía de HIF generalmente se combina con efectos nocivos en la patogénesis diabética, como un mal funcionamiento de las células beta pancreáticas en la secreción de insulina (Cheng *et al*, 2010; Gunton *et al*, 2005), inflamación, disfunción de los adipocitos (Krishnan *et al*, 2012; Takikawa *et al*, 2016) y resistencia a la insulina (Ban *et al*, 2014; Ochiai *et al*, 2011). Todos estos datos han sugerido un posible interés en el uso de HIF-1 α como diana terapéutica en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. Aunque la manipulación específica de los niveles de HIF-1 α es compleja y difícil de realizar en tejidos específicos, existen datos positivos que respaldan este nuevo enfoque. En este sentido, el uso de quelantes de hierro provoca un aumento en los niveles de HIF-1 α , ya que las hidrolasas encargadas de su degradación necesitan de este metal. Por lo tanto, el uso de compuestos como DFO (deferroxamina) demuestran la existencia de una mejora en la función y secreción de insulina en islotes de pacientes con diabetes tipo 2 (Cheng *et al*, 2010), así como una mayor tolerancia de la glucosa en ratones sometidos a una dieta alta en grasas (Zhang *et al*, 2010). En el mismo sentido, se ha demostrado cómo el uso de estos compuestos produce efectos claros sobre la vascularización y la mejora de la cicatrización (Thangarajah *et al*, 2010; Thangarajah *et al*, 2009; Xue *et al*, 2010), efectos asociados a un aumento en los niveles de HIF-1 α . Por esto motivos, decidimos analizar el efecto de la actividad hipoximimética de las NADs sobre la diferenciación de células beta, la secreción de insulina y la úlcera diabética.

La principal característica de la diabetes es un mal funcionamiento de las células beta pancreáticas que conduce a una secreción inadecuada de insulina. En este sentido, el factor HIF-1 α tiene un papel clave en la insuficiencia innata de las

células beta para secretar insulina. En primer lugar, se ha demostrado que tanto en los islotes pancreáticos aislados de pacientes con diabetes tipo 2 como en los modelos de ratones, los niveles de HIF-1 α se inhiben y juegan un papel relevante en la disfunción de las células beta (Cheng *et al*, 2010; Gunton *et al*, 2005). Además, otros trabajos anteriores demostraron que cuando el metabolismo mitocondrial se acelera debido a altos niveles de glucosa, la tasa de consumo de oxígeno aumenta, causando una menor disponibilidad de oxígeno y como consecuencia, las células beta pueden volverse hipóxicas (Bensellam *et al*, 2012; Sato *et al*, 2011). Las células responden por tanto a bajos niveles de oxígeno mediante la activación de un programa genético específico para así mejorar la adaptación al metabolismo anaeróbico y promover la conservación de energía (Semenza, 2009).

Todas estas observaciones sugieren que la inducción de HIF-1 α podría contribuir positivamente sobre la disfunción de las células beta. En paralelo, los mayores desafíos terapéuticos en el tratamiento de la diabetes son la regeneración de células beta pancreáticas a partir de progenitores pancreáticos derivados de células madre. Se ha demostrado que las células acinares pancreáticas se pueden reprogramar con éxito a células beta mediante la introducción de una combinación específica de factores de transcripción que incluyen Pdx1, Ngn3, NeuroD y MafA (Zhou *et al*, 2008). Asimismo, se ha visto que estos factores también inducen la reprogramación de células beta en la línea celular AR42J estimulada con A activina y HGF (Lima *et al*, 2012) y diferenciada a células secretoras de insulina (Mashima *et al*, 1996a; Mashima *et al*, 1996b). Obviamente, el efecto de las NADs sobre la diferenciación de células beta y la secreción de insulina tiene que ser un proceso complejo en el que intervienen más factores, además de los cambios en la expresión de diferentes factores de transcripción tales como HIF-1 α , Pdx1, etc. Se necesita una investigación más detallada para aclarar, por ejemplo, la posible participación de diferentes receptores celulares en este proceso. Se ha descrito previamente que OLDA estimula la liberación *in vitro* de insulina a partir de líneas de células de islotes que expresan endógenamente GPR119 e *in vivo* mejora la liberación de GIP y mejora la tolerancia a la glucosa de una manera dependiente de GPR119 (Chu *et al*, 2010). Del mismo modo, tanto OLDA como NADA son potentes agonistas de TRPV1 (Chu *et al*, 2003; De Petrocellis *et al*, 2004), que también ha sido implicado en la liberación de insulina (Akiba *et al*, 2004). Otro punto relevante para aclarar en investigaciones

posteriores es si la inducción de la respuesta hipóxica precede o no a la inducción del programa de diferenciación en el mecanismo de acción de las NADs. Por lo tanto, la capacidad de las NADs para inducir HIF-1 α conduciendo a una reprogramación correcta de las células beta productoras de insulina que se muestra en nuestros resultados, sugiere la necesidad de un estudio más amplio de su posible aplicación y modulación.

En este sentido, la concentración de NADs en situaciones patológicas sigue siendo desconocida, principalmente porque es difícil de analizar y porque los endolípidos se producen y se degradan rápidamente. Es por eso que nos resulta difícil especular sobre la relevancia fisiológica de las NADs en T2DM y otras patologías asociadas, especialmente con respecto a su concentración. Sin embargo, se han observado alteraciones de algunos precursores como la dopamina y los ácidos grasos de cadena larga en relación con la T2DM (Kleinridders *et al*, 2015; Lemaitre *et al*, 2015). Además, algunas NADs como NADA se han detectado a concentraciones nanomolares en el sistema nervioso de diferentes especies y en plasma humano (Chu *et al*, 2003; Hauer *et al*, 2013; Huang *et al*, 2002; Ostroumova *et al*, 2010), y se ha descrito que NADA es de corta duración y, por lo tanto, es difícil de medir (Hu *et al*, 2009; Wojtalla *et al*, 2012). Además, para algunos endocannabinoides como la *N*-araquidionil-etanolamida (AEA), se ha demostrado que los niveles dentro de las células en el sitio de inflamación pueden ser de hasta μ M (Biswas *et al*, 2003). Del mismo modo, los niveles de otros endocannabinoides son altos en las líneas celulares, como son insulinoma y los islotes pancreáticos humanos en respuesta a la estimulación de glucosa (Bermudez-Silva *et al*, 2008; Matias *et al*, 2006). Las células beta pancreáticas estimuladas con glucosa despolarizan y movilizan el calcio para producir insulina, lo que sugiere que los endocannabinoides pueden participar en la producción de insulina regulada por las células beta pancreáticas.

Además, en artículos anteriores se ha sugerido que tanto la hiperglucemia como la hipoxia son factores importantes que causan úlceras del pie diabético, ya que la hipoxia es necesaria en la cicatrización de heridas porque desempeña un papel fundamental en la regulación de procesos críticos implicados en la reparación tisular (Biswas *et al*, 2003; Tandara & Mustoe, 2004). La inducción de HIF-1 α es necesaria para la activación de factores de crecimiento angiogénicos (Kelly *et al*, 2003), el

reclutamiento de células progenitoras endoteliales (Ceradini *et al*, 2004) y la motilidad celular (Li *et al*, 2007). Otros artículos y nuestros resultados muestran que la hiperglucemia deteriora la función y la estabilización de HIF-1 α y la existencia de bajos niveles de expresión de HIF-1 α en la úlcera del pie diabético (Catrina *et al*, 2004). Por lo tanto, hay una inhibición de HIF-1 α en la cicatrización de heridas en la diabetes (Botusan *et al*, 2008). Demostramos que la inhibición de HIF-1 α para la cicatrización de heridas en el modelo diabético db/db se revierte con el tratamiento con *N*-acil dopaminas.

Entre el posible uso de las NADs hay varias opciones. Por un lado, y aunque se sabe poco sobre la biosíntesis y el catabolismo de las NADs, otros grupos han estudiado que la hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH) y la tirosina hidroxilasa median la biosíntesis de NADA y la catecol-O-metil transferasa (COMT) y las aril sulfotransferasas (ASTs) regulan su catabolismo (Hu *et al*, 2009; Wojtalla *et al*, 2012). Por lo tanto, sería interesante analizar el efecto de los inhibidores de FAAH, COMT o AST no solo en los niveles endógenos de las NADs, sino también en los marcadores de hipoxia o T2DM. Por otro lado, los niveles de estos endolípidos podrían alterarse a través de la dieta. La síntesis de NADA tiene lugar a través de la conjugación directa de dopamina con ácido araquidónico (Hu *et al*, 2009), lo que sugiere que un aumento en la disponibilidad de sus precursores podría aumentar los niveles endógenos de las NADs. Por último, y como se muestra en nuestros resultados, no podemos descartar la posibilidad de un uso directo en las patologías asociadas tanto a la hiperglucemia como a la hipoxia, como las úlceras del pie diabético (Biswas *et al*, 2003; Kalani *et al*, 1999; Kleinridders *et al*, 2015; Tandara & Mustoe, 2004). Demostramos que la inhibición de HIF-1 α en la cicatrización de heridas en el modelo diabético db/db se revierte con el tratamiento con las NADs.

En resumen, en el presente estudio mostramos cómo algunos endolípidos presentan la capacidad de inducir la diferenciación de células beta en la línea celular acinar pancreática de rata (AR42J) y células precursoras derivadas de islotes humanos (hIPCs) mediante la alteración de la vía de respuesta a hipoxia. Demostramos cómo las NADs, en particular STEARDA y PALDA, pueden modular la producción de insulina y en paralelo la inhibición inversa de HIF-1 α en un modelo de cicatrización de heridas en ratones diabéticos (db/db). Por lo tanto, la potencial modulación farmacológica de

las NADs abre la puerta al desarrollo de nuevas terapias con importantes implicaciones para las estrategias de prevención y tratamiento de la diabetes.

2. Perfil metabólico de tejido tumoral de cáncer de pulmón humano: metabolismo de nucleótidos como candidato para intervenciones terapéuticas y biomarcadores

Hasta la fecha, este estudio representa, en nuestro conocimiento, la investigación más amplia realizada en el tejido pulmonar con el objetivo de encontrar diferencias metabólicas entre los tumores de los subtipos histológicos más importantes y el tejido normal del mismo paciente. Principalmente, se ha seleccionado un número de tumores en un estadio temprano, de modo que pudiéramos tener una pista acerca de las perturbaciones bioquímicas iniciales que tienen lugar en el proceso de la tumorigénesis.

El análisis detallado del metabolismo de la glucosa mostró cambios consistentes con un efecto Warburg, hipótesis del metabolismo del cáncer donde las células que se dividen rápidamente muestran una captación elevada de glucosa, glicólisis activada con actividad aumentada de la ruta de la pentosa fosfato según se requiera para la producción de nucleótidos (Figura 28) (Jiang *et al*, 2014). Un apoyo adicional a este hecho incluye la acumulación de intermediarios del ciclo de TCA, junto a una elevación significativa de azúcar-alcoholes de pentosa y aminoazúcares. Además, niveles elevados de sorbitol también pueden contribuir a la generación de productos de glicación en cáncer de pulmón según la información obtenida de otros trabajos (Ahmad *et al*, 2017), y que también se detectaron en el presente estudio. Los niveles más altos de lactato pueden ser el resultado de un rápido desplazamiento de estos metabolitos glucolíticos para favorecer la generación de energía. En conjunto, estos hallazgos sugieren alteraciones en la captación de glucosa y su utilización podría apoyar un aumento en la actividad de la vía de la pentosa fosfato y la generación de productos de glicación que potencialmente contribuyen a la patogénesis y al crecimiento de estos tumores.

En relación con los niveles de glutatión y marcadores adicionales de estrés oxidativo, el aumento observado en MetO, niveles reducidos de glutatión, cisteína y

glicina en ambos subtipos de tumores, proporciona un mayor apoyo para los cambios que son asociados con un aumento en el estrés oxidativo (Figura 29). En este sentido, se ha demostrado que la cisteína se encuentra elevada en varios tipos de cáncer, incluido en pulmón (Gamcsik *et al*, 2012; Krepela *et al*, 1997), y la glicina descarboxilasa, enzima responsable de la degradación de la glicina, la cual se ha relacionado con células que inician el tumor en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) (Berezowska *et al*, 2017; Lin *et al*, 2017). Curiosamente, también se detectaron niveles elevados de los gamma-glutamyl aminoácidos, que son generados por la gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT). Los niveles alterados de GGT son un marcador claro del estrés oxidativo y a menudo se incrementan significativamente en el cáncer humano (Corti *et al*, 2010). Finalmente, se detectó elevados niveles de potentes antioxidantes, como ascorbato y α/γ -tocoferol, lo que respalda la idea de que en los tumores pulmonares se produce una acumulación de marcadores de estrés oxidativo y antioxidantes.

Con respecto al metabolismo de la arginina, observamos una ligera diferencia en la arginina ornitina y citrulina, así como los niveles de aspartato (Figura 30). Inicialmente, estos resultados fueron inesperados, ya que estudios previos habían descrito la existencia de un aumento de estos metabolitos en algunos tipos de cáncer (Wheatley & Campbell, 2002) y la ornitina descarboxilasa (ODC), la enzima responsable de la biogénesis de putrescina, está significativamente elevada en múltiples cánceres de pulmón (Grimminger *et al*, 2010; Tian *et al*, 2006). Sin embargo, un estudio previo de metabolómica en AC muestra resultados similares, lo que sugiere la necesidad de un análisis detallado de este aspecto (Wikoff *et al*, 2015). Por el contrario, detectamos la presencia de altos niveles de otras poliaminas en tejidos tumorales (putrescina, espermina y espermidina), así como moléculas relacionadas (N-Acetilputrescina y MTA), reguladores críticos de la estabilización de ácidos nucleicos y de la progresión del ciclo celular (Gerner & Meyskens, 2004; Pegg, 2009). En conjunto, estos resultados, junto con elevados niveles de prolina, pro-hidroxi-pro o ADMA en las muestras tumorales, sugieren un aumento en la remodelación de la matriz extracelular, la proliferación celular y la función pulmonar (Rafikova *et al*, 2016; Wells *et al*, 2009).

Estas alteraciones son consistentes junto con los cambios observados en el metabolismo de los ácidos grasos y los mediadores lipídicos. El tejido pulmonar

canceroso exhibió una acumulación significativa de múltiples ácidos grasos de cadena larga, así como de monoacilglicerol y glicerol (Figura 31), lo que es indicativo de una beta-oxidación incrementada o alterada (Nomura *et al*, 2010). Las diferencias en el metabolismo de los fosfolípidos puede reflejar un crecimiento y una renovación del tejido, así como un aumento en la degradación de las membranas durante la apoptosis (Beloribi-Djefafli *et al*, 2016; Santos & Schulze, 2012). Cabe destacar que el citrato, los lípidos conjugados con carnitina y la carnitina aparecieron significativamente más bajos en el tejido pulmonar canceroso. La disminución de los niveles de citrato puede sugerir una limitada disponibilidad de este metabolito para favorecer la síntesis de lípidos, mientras que las reducciones de los lípidos conjugados de carnitina pueden reflejar una disminución en la capacidad de transporte de lípidos a las mitocondrias (Currie *et al*, 2013). En resumen, estos cambios apoyan el crecimiento de la membrana y la proliferación celular, siendo consistente con los cambios en los niveles de poliaminas observados.

Otra vía con claro interés en el cáncer en los últimos años, es el metabolismo del carbono, principalmente debido a la necesidad de las células cancerosas para apoyar la proliferación y mejorar la supervivencia (Ducker & Rabinowitz, 2017; Newman & Maddocks, 2017). En este trabajo, múltiples metabolitos de esta ruta aparecieron alterados significativamente (glicina, sarcosina, SAH, metionina, homocisteína) (Figura 32). La literatura previa muestra que, para mantener el suministro de carbono durante la proliferación, las células tumorales convierten la serina en glicina generando metileno-THF (Tibbetts & Appling, 2010). Además, se ha sugerido que la glicina promueve el crecimiento de células tumorales en células iniciadoras de cáncer pulmón (Zhang *et al*, 2012). La acumulación significativa de la sarcosina puede dar como resultado un aumento de la biogénesis, tal como lo respalda la SAH, y se ha demostrado que se correlaciona con una mayor metilación y agresividad tumoral en otros cánceres (Cernei *et al*, 2013).

Finalmente, y como discutimos anteriormente, observamos un aumento significativo en los niveles de ribosa-5-fosfato en el tejido tumoral. Recientemente se ha descrito que las células tumorales redireccionan el flujo de glucosa para generar ribosa-5-fosfato, para aumentar la síntesis de nucleótidos y mantener una tasa de crecimiento elevada (Ciou *et al*, 2015). Estos datos, junto con el papel relevante del

catabolismo de nucleótidos en la replicación del ADN, nos llevaron a analizar esta vía en detalle. En primer lugar, se detectaron niveles más altos de productos iniciales tales como AMP en tejidos tumorales, que se acompañaron por la ausencia de cambios significativos en GMP (monofosfato de guanosina) (Figura 33). Estos datos sugieren un cambio en la ruta que favorece la síntesis de AMP. El análisis de la expresión diferencial de las enzimas implicadas en esta ruta, mostró un aumento significativo en la expresión de GMPR (guanosina monofosfato reductasa) y ADSL (adenosuccinato liasa) en AC y SCC en comparación con tejido normal (Figura 40A). La enzima GMPR cataliza una reacción inversa que convierte GMP en IMP, manteniendo elevados los niveles de este metabolito. Apoyando estos resultados, también encontramos una sobreexpresión tanto a nivel génico como a nivel proteico de ADSL en tejido tumoral tanto en AC como en SCC, la enzima a cargo de la síntesis de AMP (Figura 40 y 41). Estos datos prueban la existencia de una activación de la síntesis *de novo* que favorece la síntesis de AMP, reflejando un aumento en la renovación de ATP/AMP, la cual viene respaldada por niveles significativamente más altos de múltiples productos catabólicos purínicos tales como inosina, hipoxantina, xantina y xantosina.

En relación con estos resultados, la enzima ADSL se ha descrito como relevante para la formación de un complejo llamado purinosoma, formado por 6 enzimas encargadas de realizar diez reacciones secuenciales en el paso de PRPP (fosforribosil pirofosfato) a IMP (An *et al*, 2008). Este complejo se forma en situaciones de alta demanda de purinas para así aumentar el flujo metabólico de la síntesis *de novo* y para complementar la ruta de recuperación. Aunque en algunos aspectos se puede discutir la existencia de este complejo, las alteraciones de la vía *de novo* en varias enfermedades humanas han hecho que el purinosoma se considere un objetivo terapéutico para tratamientos clínicos (Zhao *et al*, 2013), incluida la oncología (Zhang *et al*, 2015). En este sentido, otros grupos han descrito anteriormente que la deficiencia de ADSL y ATIC afecta a la formación y ensamblaje de purinosomas, y hay evidencias de que ambas enzimas son clave en la regulación de la ruta de síntesis de purinas durante el desarrollo tumoral (Baresova *et al*, 2012; Jurecka *et al*, 2015). Nuestros resultados demuestran la existencia de un aumento en la expresión de ambas enzimas a nivel de proteína en el tejido tumoral de pulmón en comparación con tejido sano del mismo paciente tanto en SSC como AC. Estos resultados también se validan a través del análisis de los datos disponibles de los estudios públicos de genómica del cáncer,

Además, mostramos la existencia de una clara relación significativa entre la supervivencia y la expresión de *ATIC* o *ADSL* (Figura 42). Se observó la existencia de una supervivencia opuesta en la expresión de *ADSL* según los subtipos histológicos analizados, lo cual es especialmente relevante, ya que podría deberse a un gen con un papel clave en la diferenciación entre ambos subtipos histológicos. Todos estos datos confirman la posible función de explorar el purinosoma como un objetivo terapéutico contra el cáncer de pulmón.

También detectamos en tumores un aumento en la expresión de metabolitos implicados en la ruta de las pirimidinas tales como citidina-3 'y 5'-monofosfato (CMP), uridina, citidina, uracilo o 5,6-dihidrouracilo (Figura 33). En este sentido, la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), enzima responsable de la producción de 5,6-dihidrouracilo como producto de oxidación del uracilo en humanos, muestra una mayor actividad y expresión en adenocarcinomas de pulmón en comparación con el tejido sano. Además, su actividad también se ha relacionado con una mejora en la eficacia de los efectos citotóxicos de la terapia adyuvante postoperatoria en NSCLC (Miyoshi *et al*, 2005; Shintani *et al*, 2011). Recientemente, se ha demostrado que 5,6-dihidrouracilo es elevado en AC (Wikoff *et al*, 2015).

Finalmente, el análisis estadístico de los resultados del presente estudio evidencia la existencia de cambios en el metabolismo de nucleótidos del tejido tumoral frente al tejido sano, los cuales fueron particularmente más relevantes en SCC que en AC. Además, estos resultados también revelaron la existencia de diferencias en los niveles de metabolitos en AC frente a SCC, lo que significa que ambos subtipos histológicos regulan el metabolismo de nucleótidos de una manera diferente (Figura 35). Este hecho fue respaldado por la comparación de los metabolitos con una elevada capacidad de discriminación de AC y SCC (Figura 37). En el caso de AC, la capacidad predictiva de los 5 mejores metabolitos, analizados fue muy relevante. La sensibilidad fue siempre superior a 0.787, mientras que la especificidad fue superior a 0.818, con especial mención a 5,6-dihidrouracilo (Figura 38A). La capacidad predictiva fue aún mejor para el subtipo SCC, ya que los valores de sensibilidad y especificidad siempre estuvieron por encima de 0.914, con especial énfasis en 2'-O-metilguanosina y 5-metiluridina, los dos metabolitos con mayor capacidad de discriminación. De hecho, los gráficos de caja revelan que el rango de concentración detectado para ambos

metabolitos en el tejido pulmonar no se solapaba prácticamente en el tejido de SCC y su tejido normal correspondiente (Figura 38B). Una tendencia común encontrada para los nucleótidos fue que sus concentraciones se caracterizaban por un patrón común, siempre estaban más concentradas en los tejidos cancerosos en comparación con los tejidos normales, tanto para los casos de AC como de SCC, lo que es claramente indicativo de un hipermetabolismo.

Conclusiones

VIII. CONCLUSIONES

1. La ruta de respuesta a hipoxia se encuentra alterada durante la diferenciación de la célula beta, la cual va acompañada por una inducción del factor de transcripción HIF-1 α y HIF-2 α en las células AR42J.
2. Las *N*-acil dopaminas tienen la capacidad de inducir la expresión de HIF-1 α y la diferenciación de células beta productoras de insulina en los modelos celulares AR42J y hIPCS.
3. Las *N*-acil dopaminas inducen la producción de insulina en células AR42J y hIPCs.
4. STEARDA y PALDA promueven la angiogénesis en modelos *in vitro*.
5. El tratamiento tópico con STEARDA y PALDA mejora la cicatrización de heridas en modelos murinos (db/db), a través de la estabilización de la vía de respuesta a hipoxia.
6. Un análisis detallado de los cambios metabólicos que tienen lugar entre los subtipos histológicos más importantes en cáncer de pulmón con respecto al tejido normal, muestra importantes alteraciones en las rutas bioquímicas más relevantes, con un interés relevancia en el metabolismo de los nucleótidos.
7. En muestras tumorales existe una acumulación de marcadores de estrés oxidativo y antioxidantes en comparación con las muestras sanas.
8. Las muestras tumorales presentan un elevado nivel de oxidación de ácidos grasos.
9. La expresión de las proteínas ATIC y ADSL son más intensas en los tejidos de AC y SCC en comparación con el tejido sano.
10. Los resultados obtenidos permiten identificar metabolitos con un papel discriminatorio para los dos tipos de carcinoma de pulmón más diagnosticados

y, por lo tanto, con posible capacidad predictiva o uso como marcadores diagnósticos, abriendo la puerta al descubrimiento de nuevas dianas de intervención terapéutica.

Bibliografía

Aboud OA, Weiss RH (2013) New opportunities from the cancer metabolome. *Clinical chemistry* **59**: 138-146

Ahmad S, Khan MY, Rafi Z, Khan H, Siddiqui Z, Rehman S, Shahab U, Khan MS, Saeed M, Alouffi S, Khan MS (2017) Oxidation, glycation and glycoxidation-The vicious cycle and lung cancer. *Seminars in cancer biology*

Akiba Y, Kato S, Katsube K, Nakamura M, Takeuchi K, Ishii H, Hibi T (2004) Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochemical and biophysical research communications* **321**: 219-225

Akimov MG, Gretskaia NM, Shevchenko KV, Shevchenko VP, Miasoedov NF, Bobrov M, Bezuglov VV (2007) [New aspects of biosynthesis and metabolism of N-acyldopamines in rat tissues]. *Bioorganicheskaya khimiya* **33**: 648-652

Alexiadou K, Doupis J (2012) Management of diabetic foot ulcers. *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders* **3**: 4

An S, Kumar R, Sheets ED, Benkovic SJ (2008) Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science* **320**: 103-106

Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *The Journal of biological chemistry* **279**: 38458-38465

Armitage EG, Southam AD (2016) Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* **12**: 146

Bae MK, Ahn MY, Jeong JW, Bae MH, Lee YM, Bae SK, Park JW, Kim KR, Kim KW (2002) Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability. *The Journal of biological chemistry* **277**: 9-12

Baek JH, Mahon PC, Oh J, Kelly B, Krishnamachary B, Pearson M, Chan DA, Giaccia AJ, Semenza GL (2005) OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1alpha and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1alpha. *Molecular cell* **17**: 503-512

Ban JJ, Ruthenborg RJ, Cho KW, Kim JW (2014) Regulation of obesity and insulin resistance by hypoxia-inducible factors. *Hypoxia* **2**: 171-183

Bardos JI, Ashcroft M (2005) Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochimica et biophysica acta* **1755**: 107-120

Baresova V, Skopova V, Sikora J, Patterson D, Sovova J, Zikanova M, Kmoch S (2012) Mutations of ATIC and ADSL affect purinosome assembly in cultured skin fibroblasts from patients with AICA-ribosiduria and ADSL deficiency. *Human molecular genetics* **21**: 1534-1543

- Beloribi-Djefalia S, Vasseur S, Guillaumond F (2016) Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* **5**: e189
- Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A (2002) Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circulation research* **90**: 784-791
- Bensellam M, Duvillie B, Rybachuk G, Laybutt DR, Magnan C, Guiot Y, Pouyssegur J, Jonas JC (2012) Glucose-induced O(2) consumption activates hypoxia inducible factors 1 and 2 in rat insulin-secreting pancreatic beta-cells. *PloS one* **7**: e29807
- Berezowska S, Galvan JA, Langer R, Bubendorf L, Savic S, Gugger M, Schmid RA, Marti TM (2017) Glycine decarboxylase and HIF-1alpha expression are negative prognostic factors in primary resected early-stage non-small cell lung cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **470**: 323-330
- Bermudez-Silva FJ, Suarez J, Baixeras E, Cobo N, Bautista D, Cuesta-Munoz AL, Fuentes E, Juan-Pico P, Castro MJ, Milman G, Mechoulam R, Nadal A, Rodriguez de Fonseca F (2008) Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia* **51**: 476-487
- Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *The EMBO journal* **22**: 4082-4090
- Bertout JA, Patel SA, Simon MC (2008) The impact of O2 availability on human cancer. *Nature reviews Cancer* **8**: 967-975
- Bhalla K, Hwang BJ, Dewi RE, Ou L, Twaddel W, Fang HB, Vafai SB, Vazquez F, Puigserver P, Boros L, Girnun GD (2011) PGC1alpha promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis. *Cancer research* **71**: 6888-6898
- Bishop T, Gallagher D, Pascual A, Lygate CA, de Bono JP, Nicholls LG, Ortega-Saenz P, Oster H, Wijeyekoon B, Sutherland AI, Grosfeld A, Aragones J, Schneider M, van Geyte K, Teixeira D, Diez-Juan A, Lopez-Barneo J, Channon KM, Maxwell PH, Pugh CW, Davies AM, Carmeliet P, Ratcliffe PJ (2008) Abnormal sympathoadrenal development and systemic hypotension in PHD3^{-/-} mice. *Molecular and cellular biology* **28**: 3386-3400
- Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V (2000) N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *The Biochemical journal* **351 Pt 3**: 817-824
- Biswas KK, Sarker KP, Abeyama K, Kawahara K, Iino S, Otsubo Y, Saigo K, Izumi H, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Yamaji K, Endo R, Suzuki K, Imaizumi H, Maruyama I (2003) Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis. *Hepatology* **38**: 1167-1177

Boros LG, Lerner MR, Morgan DL, Taylor SL, Smith BJ, Postier RG, Brackett DJ (2005) [1,2-¹³C₂]-D-glucose profiles of the serum, liver, pancreas, and DMBA-induced pancreatic tumors of rats. *Pancreas* **31**: 337-343

Bothwell JH, Griffin JL (2011) An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **86**: 493-510

Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S, Pereira T, Yla-Herttuala S, Poellinger L, Brismar K, Catrina SB (2008) Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 19426-19431

Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J (2005) Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cellular signalling* **17**: 1-9

Brown MV, McDunn JE, Gunst PR, Smith EM, Milburn MV, Troyer DA, Lawton KA (2012) Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies. *Genome medicine* **4**: 33

Bruegge K, Jelkmann W, Metzen E (2007) Hydroxylation of hypoxia-inducible transcription factors and chemical compounds targeting the HIF-alpha hydroxylases. *Current medicinal chemistry* **14**: 1853-1862

Bruick RK, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**: 1337-1340

Calderon-Santiago M, Priego-Capote F, Turck N, Robin X, Jurado-Gamez B, Sanchez JC, Luque de Castro MD (2015) Human sweat metabolomics for lung cancer screening. *Analytical and bioanalytical chemistry* **407**: 5381-5392

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E (1998) Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**: 485-490

Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP (2013) Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature reviews Cancer* **13**: 227-232

Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L (2000) Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular and cellular biology* **20**: 402-415

Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, Brismar K, Poellinger L (2004) Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1alpha protein stability and function. *Diabetes* **53**: 3226-3232

Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC (2004) Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine* **10**: 858-864

Cernei N, Heger Z, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Babula P, Eckschlager T, Stiborova M, Kizek R, Adam V (2013) Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker--a review. *Int j mol sci* **14**: 13893-13908

Chan DA, Giaccia AJ (2007) Hypoxia, gene expression, and metastasis. *Cancer metastasis reviews* **26**: 333-339

Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **276**: 9519-9525

Cheng K, Ho K, Stokes R, Scott C, Lau SM, Hawthorne WJ, O'Connell PJ, Loudovaris T, Kay TW, Kulkarni RN, Okada T, Wang XL, Yim SH, Shah Y, Grey ST, Biankin AV, Kench JG, Laybutt DR, Gonzalez FJ, Kahn CR, Gunton JE (2010) Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates beta cell function in mouse and human islets. *The Journal of clinical investigation* **120**: 2171-2183

Choi D, Cai EP, Schroer SA, Wang L, Woo M (2011) Vhl is required for normal pancreatic beta cell function and the maintenance of beta cell mass with age in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **91**: 527-538

Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM (2003) N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *The Journal of biological chemistry* **278**: 13633-13639

Chu ZL, Carroll C, Chen R, Alfonso J, Gutierrez V, He H, Lucman A, Xing C, Sebring K, Zhou J, Wagner B, Unett D, Jones RM, Behan DP, Leonard J (2010) N-oleoyldopamine enhances glucose homeostasis through the activation of GPR119. *Molecular endocrinology* **24**: 161-170

Ciou SC, Chou YT, Liu YL, Nieh YC, Lu JW, Huang SF, Chou YT, Cheng LH, Lo JF, Chen MJ, Yang MC, Yuh CH, Wang HD (2015) Ribose-5-phosphate isomerase A regulates hepatocarcinogenesis via PP2A and ERK signaling. *International journal of cancer* **137**: 104-115

Collino S, Martin FP, Rezzi S (2013) Clinical metabolomics paves the way towards future healthcare strategies. *British journal of clinical pharmacology* **75**: 619-629

Connor M, Vaughan CW, Vandenberg RJ (2010) N-acyl amino acids and N-acyl neurotransmitter conjugates: neuromodulators and probes for new drug targets. *British journal of pharmacology* **160**: 1857-1871

Cormier-Regard S, Nguyen SV, Claycomb WC (1998) Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **273**: 17787-17792

Corti A, Franzini M, Paolicchi A, Pompella A (2010) Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting. *Anticancer research* **30**: 1169-1181

Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV, Jr. (2013) Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell metabolism* **18**: 153-161

Dang CV, Semenza GL (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences* **24**: 68-72

Dang HT, Kang GJ, Yoo ES, Hong J, Choi JS, Kim HS, Chung HY, Jung JH (2011) Evaluation of endogenous fatty acid amides and their synthetic analogues as potential anti-inflammatory leads. *Bioorganic & medicinal chemistry* **19**: 1520-1527

De Petrocellis L, Chu CJ, Moriello AS, Kellner JC, Walker JM, Di Marzo V (2004) Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. *British journal of pharmacology* **143**: 251-256

Dehaven CD, Evans AM, Dai H, Lawton KA (2010) Organization of GC/MS and LC/MS metabolomics data into chemical libraries. *Journal of cheminformatics* **2**: 9

Diaz R, Pozo OJ, Sancho JV, Hernandez F (2014) Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food chemistry* **157**: 84-93

Ducker GS, Rabinowitz JD (2017) One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell metabolism* **25**: 27-42

Eckhart AD, Yang N, Xin X, Faber JE (1997) Characterization of the alpha1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 9487-9492

Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *The EMBO journal* **18**: 1905-1914

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**: 43-54

Evans AM, DeHaven CD, Barrett T, Mitchell M, Milgram E (2009) Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Analytical chemistry* **81**: 6656-6667

Fahrmann JF, Grapov DD, Wanichthanarak K, DeFelice BC, Salemi MR, Rom WN, Gandara DR, Phinney BS, Fiehn O, Pass H, Miyamoto S (2017) Integrated Metabolomics and Proteomics Highlight Altered Nicotinamide- and Polyamine Pathways in Lung Adenocarcinoma. *Carcinogenesis*

Falco M, Palma G, Rea D, De Biase D, Scala S, D'Aiuto M, Facchini G, Perdona S, Barbieri A, Arra C (2016) Tumour biomarkers: homeostasis as a novel prognostic indicator. *Open biology* **6**

Fan TW, Lane AN, Higashi RM, Farag MA, Gao H, Bousamra M, Miller DM (2009) Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Molecular cancer* **8**: 41

Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M (2006) Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovascular research* **71**: 642-651

Farrell F, Lee A (2004) The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *The oncologist* **9 Suppl 5**: 18-30

Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer research* **59**: 3915-3918

Fong GH (2008) Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* **11**: 121-140

Formenti F, Constantin-Teodosiu D, Emmanuel Y, Cheeseman J, Dorrington KL, Edwards LM, Humphreys SM, Lappin TR, McMullin MF, McNamara CJ, Mills W, Murphy JA, O'Connor DF, Percy MJ, Ratcliffe PJ, Smith TG, Treacy M, Frayn KN, Greenhaff PL, Karpe F, Clarke K, Robbins PA (2010) Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 12722-12727

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* **16**: 4604-4613

Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *The Biochemical journal* **396**: 517-527

Fuhrer T, Zamboni N (2015) High-throughput discovery metabolomics. *Current opinion in biotechnology* **31**: 73-78

Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* **129**: 111-122

Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Kamada S, Saito K, Iizumi M, Liu W, Ericsson J, Watabe K (2008) Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1. *Cancer research* **68**: 1003-1011

Galeano M, Deodato B, Altavilla D, Cucinotta D, Arsic N, Marini H, Torre V, Giacca M, Squadrito F (2003) Adeno-associated viral vector-mediated human vascular endothelial

growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetologia* **46**: 546-555

Gamcsik MP, Kasibhatla MS, Teeter SD, Colvin OM (2012) Glutathione levels in human tumors. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* **17**: 671-691

Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**: 891-899

Gerner EW, Meyskens FL, Jr. (2004) Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature reviews Cancer* **4**: 781-792

Gladek I, Ferdin J, Horvat S, Calin GA, Kunej T (2017) HIF1A gene polymorphisms and human diseases: Graphical review of 97 association studies. *Genes, chromosomes & cancer* **56**: 439-452

Gordan JD, Thompson CB, Simon MC (2007) HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer cell* **12**: 108-113

Griffiths WJ, Koal T, Wang Y, Kohl M, Enot DP, Daigner HP (2010) Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angewandte Chemie* **49**: 5426-5445

Grimminger PP, Schneider PM, Metzger R, Vallbohmer D, Danenberg KD, Danenberg PV, Holscher AH, Brabender J (2010) Ornithine decarboxylase mRNA expression in curatively resected non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer* **11**: 114-119

Groulx I, Lee S (2002) Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Molecular and cellular biology* **22**: 5319-5336

Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, Okada T, Hawthorne WJ, Tseng YH, Roberson RS, Ricordi C, O'Connell PJ, Gonzalez FJ, Kahn CR (2005) Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* **122**: 337-349

Harris AL (2002) Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews Cancer* **2**: 38-47

Hauer D, Schelling G, Gola H, Campolongo P, Morath J, Roozendaal B, Hamuni G, Karabatsiakakis A, Atsak P, Vogeser M, Kolassa IT (2013) Plasma concentrations of endocannabinoids and related primary fatty acid amides in patients with post-traumatic stress disorder. *PloS one* **8**: e62741

Haznadar M, Cai Q, Krausz KW, Bowman ED, Margono E, Noro R, Thompson MD, Mathe EA, Munro HM, Steinwandel MD, Gonzalez FJ, Blot WJ, Harris CC (2016) Urinary Metabolite Risk Biomarkers of Lung Cancer: A Prospective Cohort Study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **25**: 978-986

Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W (2005) Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **25**: 297-310

Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Schofield CJ (2002) Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *The Journal of biological chemistry* **277**: 26351-26355

Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY (2002) Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* **417**: 975-978

Hori S, Nishiumi S, Kobayashi K, Shinohara M, Hatakeyama Y, Kotani Y, Hatano N, Maniwa Y, Nishio W, Bamba T, Fukusaki E, Azuma T, Takenawa T, Nishimura Y, Yoshida M (2011) A metabolomic approach to lung cancer. *Lung cancer* **74**: 284-292

Hu J, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA (1998) Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochemical and biophysical research communications* **245**: 894-899

Hu SS, Bradshaw HB, Benton VM, Chen JS, Huang SM, Minassi A, Bisogno T, Masuda K, Tan B, Roskoski R, Jr., Cravatt BF, Di Marzo V, Walker JM (2009) The biosynthesis of N-arachidonoyl dopamine (NADA), a putative endocannabinoid and endovanilloid, via conjugation of arachidonic acid with dopamine. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **81**: 291-301

Huang D, Li C, Zhang H (2014) Hypoxia and cancer cell metabolism. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **46**: 214-219

Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* **271**: 32253-32259

Huang LE, Bindra RS, Glazer PM, Harris AL (2007) Hypoxia-induced genetic instability-a calculated mechanism underlying tumor progression. *Journal of molecular medicine* **85**: 139-148

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 8400-8405

Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Jr., Goldberg MA (1996) Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 10595-10599

Israel M, Schwartz L (2011) The metabolic advantage of tumor cells. *Molecular cancer* **10**: 70

Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, Michelson KS, Gunzler V, Kondo K, Yang H, Sorokina I, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG, Jr. (2002) Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13459-13464

Ivan M, Kaelin WG, Jr. (2001) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Current opinion in genetics & development* **11**: 27-34

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**: 464-468

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**: 468-472

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* **271**: 17771-17778

Jiang C, Qu A, Matsubara T, Chanturiya T, Jou W, Gavrilova O, Shah YM, Gonzalez FJ (2011) Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* **60**: 2484-2495

Jiang P, Du W, Wu M (2014) Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell* **5**: 592-602

Jordan KW, Adkins CB, Su L, Halpern EF, Mark EJ, Christiani DC, Cheng LL (2010) Comparison of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung by metabolomic analysis of tissue-serum pairs. *Lung cancer* **68**: 44-50

Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A (2012) Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International journal of molecular sciences* **13**: 3145-3175

Jurecka A, Zikanova M, Kmoch S, Tylki-Szymanska A (2015) Adenylosuccinate lyase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* **38**: 231-242

Kalani M, Brismar K, Fagrell B, Ostergren J, Jorneskog G (1999) Transcutaneous oxygen tension and toe blood pressure as predictors for outcome of diabetic foot ulcers. *Diabetes care* **22**: 147-151

Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L (1997) Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 5667-5672

Kami K, Fujimori T, Sato H, Sato M, Yamamoto H, Ohashi Y, Sugiyama N, Ishihama Y, Onozuka H, Ochiai A, Esumi H, Soga T, Tomita M (2013) Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* **9**: 444-453

Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW (2000) Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10430-10435

Ke Q, Costa M (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology* **70**: 1469-1480

Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL (2003) Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circulation research* **93**: 1074-1081

Kietzmann T, Roth U, Jungermann K (1999) Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* **94**: 4177-4185

Kim JW, Dang CV (2006) Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer research* **66**: 8927-8930

Kirito K, Hu Y, Komatsu N (2009) HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. *Cell cycle* **8**: 2844-2849

Kleinridders A, Cai W, Cappellucci L, Ghazarian A, Collins WR, Vienberg SG, Pothos EN, Kahn CR (2015) Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 3463-3468

Kline DD, Peng YJ, Manalo DJ, Semenza GL, Prabhakar NR (2002) Defective carotid body function and impaired ventilatory responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 821-826

Kojima H, Gu H, Nomura S, Caldwell CC, Kobata T, Carmeliet P, Semenza GL, Sitkovsky MV (2002) Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha -deficient chimeric mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 2170-2174

Kordalewska M, Markuszewski MJ (2015) Metabolomics in cardiovascular diseases. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **113**: 121-136

Kothari S, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Bailes M, Ens K, Kirshenbaum LA, Gibson SB (2003) BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene* **22**: 4734-4744

- Krepela E, Prochazka J, Karova B, Cermak J, Roubkova H (1997) Cathepsin B, thiols and cysteine protease inhibitors in squamous-cell lung cancer. *Neoplasma* **44**: 219-239
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer research* **63**: 1138-1143
- Krishnan J, Danzer C, Simka T, Ukropec J, Walter KM, Kumpf S, Mirtschink P, Ukropcova B, Gasperikova D, Pedrazzini T, Krek W (2012) Dietary obesity-associated Hif1alpha activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD+ system. *Genes & development* **26**: 259-270
- Krumsiek J, Suhre K, Evans AM, Mitchell MW, Mohny RP, Milburn MV, Wägele B, Romisch-Margl W, Illig T, Adamski J, Gieger C, Theis FJ, Kastenmüller G (2012) Mining the unknown: a systems approach to metabolite identification combining genetic and metabolic information. *PLoS genetics* **8**: e1003005
- Kumar N, Shahjaman M, Mollah MNH, Islam SMS, Hoque MA (2017) Serum and Plasma Metabolomic Biomarkers for Lung Cancer. *Bioinformation* **13**: 202-208
- Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, Prabhakar NR (2006) Oxygen sensing in the body. *Progress in biophysics and molecular biology* **91**: 249-286
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML (2002) Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **295**: 858-861
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and cellular biology* **21**: 3995-4004
- Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **272**: 5375-5381
- Lehner R, Quiroga AD (2016) Chapter 5 - Fatty Acid Handling in Mammalian Cells A2 - Ridgway, Neale D. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)*, McLeod RS (ed), pp 149-184. Boston: Elsevier
- Lemaitre RN, Fretts AM, Sitlani CM, Biggs ML, Mukamal K, King IB, Song X, Djousse L, Siscovick DS, McKnight B, Sotoodehnia N, Kizer JR, Mozaffarian D (2015) Plasma phospholipid very-long-chain saturated fatty acids and incident diabetes in older adults: the Cardiovascular Health Study. *The American journal of clinical nutrition* **101**: 1047-1054
- Li W, Li Y, Guan S, Fan J, Cheng CF, Bright AM, Chinn C, Chen M, Woodley DT (2007) Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *The EMBO journal* **26**: 1221-1233

- Liao D, Johnson RS (2007) Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer metastasis reviews* **26**: 281-290
- Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R, Taubman MB (2002) Mammalian EGLN genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **80**: 421-426
- Liesenfeld DB, Habermann N, Owen RW, Scalbert A, Ulrich CM (2013) Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **22**: 2182-2201
- Lima MJ, Docherty HM, Chen Y, Docherty K (2012) Efficient differentiation of AR42J cells towards insulin-producing cells using pancreatic transcription factors in combination with growth factors. *Molecular and cellular endocrinology* **358**: 69-80
- Lin J, Lee JHJ, Paramasivam K, Pathak E, Wang Z, Pramono ZAD, Lim B, Wee KB, Surana U (2017) Induced-Decay of Glycine Decarboxylase Transcripts as an Anticancer Therapeutic Strategy for Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Molecular therapy Nucleic acids* **9**: 263-273
- Louis E, Cantrelle FX, Mesotten L, Reekmans G, Bervoets L, Vanhove K, Thomeer M, Lippens G, Adriaensens P (2017) Metabolic phenotyping of human plasma by (1) H-NMR at high and medium magnetic field strengths: a case study for lung cancer. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **55**: 706-713
- Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M (2007) Hypoxia-dependent anti-inflammatory pathways in protection of cancerous tissues. *Cancer metastasis reviews* **26**: 273-279
- Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, Semenza GL (2011) Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **145**: 732-744
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & development* **15**: 2675-2686
- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell* **40**: 294-309
- Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, Taglienti CA, Gouvin LM, Sharma VM, Mercurio AM (2010) ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer cell* **17**: 319-332
- Makarov P, Kropf S, Wiswedel I, Augustin W, Schild L (2006) Consumption of redox energy by glutathione metabolism contributes to hypoxia/ reoxygenation-induced injury in astrocytes. *Molecular and cellular biochemistry* **286**: 95-101

Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* **105**: 659-669

Martin C, Yu AY, Jiang BH, Davis L, Kimberly D, Hohimer AR, Semenza GL (1998) Cardiac hypertrophy in chronically anemic fetal sheep: Increased vascularization is associated with increased myocardial expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1. *American journal of obstetrics and gynecology* **178**: 527-534

Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I (1996a) Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *The Journal of clinical investigation* **97**: 1647-1654

Mashima H, Shibata H, Mine T, Kojima I (1996b) Formation of insulin-producing cells from pancreatic acinar AR42J cells by hepatocyte growth factor. *Endocrinology* **137**: 3969-3976

Masson N, Ratcliffe PJ (2003) HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *Journal of cell science* **116**: 3041-3049

Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *The EMBO journal* **20**: 5197-5206

Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V (2006) Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**: 3171-3180

Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L (1995) A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *The Journal of experimental medicine* **182**: 1683-1693

Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J (2003) Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *Journal of cell science* **116**: 1319-1326

Miyoshi T, Kondo K, Fujino H, Takahashi Y, Sawada N, Sakiyama S, Tsuyuguchi M, Kimura S, Sumitomo M, Monden Y (2005) Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in non-small cell lung cancer: relationship between mRNA expression and activity. *Anticancer research* **25**: 923-930

Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW (2007) Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer metastasis reviews* **26**: 241-248

- Mu D, Jiang X, Sheldon RA, Fox CK, Hamrick SE, Vexler ZS, Ferriero DM (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model. *Neurobiology of disease* **14**: 524-534
- Mylonis I, Sembongi H, Befani C, Liakos P, Siniossoglou S, Simos G (2012) Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *Journal of cell science* **125**: 3485-3493
- Nakayama K, Ronai Z (2004) Siah: new players in the cellular response to hypoxia. *Cell cycle* **3**: 1345-1347
- National Lung Screening Trial Research T, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD (2011) Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *The New England journal of medicine* **365**: 395-409
- Navarrete CM, Fiebich BL, de Vinuesa AG, Hess S, de Oliveira AC, Candelario-Jalil E, Caballero FJ, Calzado MA, Munoz E (2009) Opposite effects of anandamide and N-arachidonoyl dopamine in the regulation of prostaglandin E and 8-iso-PGF formation in primary glial cells. *Journal of neurochemistry* **109**: 452-464
- Navarrete CM, Perez M, de Vinuesa AG, Collado JA, Fiebich BL, Calzado MA, Munoz E (2010) Endogenous N-acyl-dopamines induce COX-2 expression in brain endothelial cells by stabilizing mRNA through a p38 dependent pathway. *Biochemical pharmacology* **79**: 1805-1814
- Naz S, Vallejo M, Garcia A, Barbas C (2014) Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of chromatography A* **1353**: 99-105
- Newman AC, Maddocks ODK (2017) One-carbon metabolism in cancer. *British journal of cancer* **116**: 1499-1504
- Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, Cravatt BF (2010) Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell* **140**: 49-61
- Noordeen NA, Khera TK, Sun G, Longbottom ER, Pullen TJ, da Silva Xavier G, Rutter GA, Leclerc I (2010) Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) is a negative regulator of ARNT/HIF-1beta gene expression in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* **59**: 153-160
- O'Shea K, Cameron SJ, Lewis KE, Lu C, Mur LA (2016) Metabolomic-based biomarker discovery for non-invasive lung cancer screening: A case study. *Biochimica et biophysica acta* **1860**: 2682-2687
- Ochiai D, Goda N, Hishiki T, Kanai M, Senoo-Matsuda N, Soga T, Johnson RS, Yoshimura Y, Suematsu M (2011) Disruption of HIF-1alpha in hepatocytes impairs glucose metabolism in diet-induced obesity mice. *Biochemical and biophysical research communications* **415**: 445-449

Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hutter J, Schramm M, Flamme I (2002) Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochemical and biophysical research communications* **296**: 343-349

Ostroumova TV, Markova LN, Akimov MG, Gretskaia NM, Bezuglov VV (2010) [Docosahexaenoyl dopamine in freshwater hydra: effects on regeneration and metabolic changes]. *Ontogenez* **41**: 199-203

Pegg AE (2009) Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB life* **61**: 880-894

Pillai R, Huypens P, Huang M, Schaefer S, Sheinin T, Wettig SD, Joseph JW (2011) Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor-1{beta} plays a critical role in maintaining glucose-stimulated anaplerosis and insulin release from pancreatic {beta}-cells. *The Journal of biological chemistry* **286**: 1014-1024

Poisson LM, Munkarah A, Madi H, Datta I, Hensley-Alford S, Tebbe C, Buekers T, Giri S, Rattan R (2015) A metabolomic approach to identifying platinum resistance in ovarian cancer. *Journal of ovarian research* **8**: 13

Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**: 437-443

Prabhakar NR, Semenza GL (2015) Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiology* **30**: 340-348

Puri S, Cano DA, Hebrok M (2009) A role for von Hippel-Lindau protein in pancreatic beta-cell function. *Diabetes* **58**: 433-441

Rafikova O, Meadows ML, Kinchen JM, Mohny RP, Maltepe E, Desai AA, Yuan JX, Garcia JG, Fineman JR, Rafikov R, Black SM (2016) Metabolic Changes Precede the Development of Pulmonary Hypertension in the Monocrotaline Exposed Rat Lung. *PloS one* **11**: e0150480

Ramakrishnan SK, Zhang H, Takahashi S, Centofanti B, Periyasamy S, Weisz K, Chen Z, Uhler MD, Rui L, Gonzalez FJ, Shah YM (2016) HIF2alpha Is an Essential Molecular Brake for Postprandial Hepatic Glucagon Response Independent of Insulin Signaling. *Cell metabolism* **23**: 505-516

Rankin EB, Rha J, Unger TL, Wu CH, Shutt HP, Johnson RS, Simon MC, Keith B, Haase VH (2008) Hypoxia-inducible factor-2 regulates vascular tumorigenesis in mice. *Oncogene* **27**: 5354-5358

Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M (2014) Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in immunology* **5**: 532

Rausch LK, Netzer NC, Hoegel J, Pramsohler S (2017) The Linkage between Breast Cancer, Hypoxia, and Adipose Tissue. *Frontiers in oncology* **7**: 211

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes & development* **14**: 34-44

Reitman ZJ, Jin G, Karoly ED, Spasojevic I, Yang J, Kinzler KW, He Y, Bigner DD, Vogelstein B, Yan H (2011) Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 3270-3275

Rijk JC, Lommen A, Essers ML, Groot MJ, Van Hende JM, Doeswijk TG, Nielen MW (2009) Metabolomics approach to anabolic steroid urine profiling of bovines treated with prohormones. *Analytical chemistry* **81**: 6879-6888

Roberts CK, Hevener AL, Barnard RJ (2013) Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Comprehensive Physiology* **3**: 1-58

Rocha CM, Barros AS, Gil AM, Goodfellow BJ, Humpfer E, Spraul M, Carreira IM, Melo JB, Bernardo J, Gomes A, Sousa V, Carvalho L, Duarte IF (2010) Metabolic profiling of human lung cancer tissue by 1H high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *Journal of proteome research* **9**: 319-332

Rocha CM, Barros AS, Goodfellow BJ, Carreira IM, Gomes A, Sousa V, Bernardo J, Carvalho L, Gil AM, Duarte IF (2015) NMR metabolomics of human lung tumours reveals distinct metabolic signatures for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* **36**: 68-75

Rocha S (2007) Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends in biochemical sciences* **32**: 389-397

Ruas JL, Poellinger L, Pereira T (2002) Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **277**: 38723-38730

Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *The Journal of biological chemistry* **272**: 22642-22647

Santos CR, Schulze A (2012) Lipid metabolism in cancer. *The FEBS journal* **279**: 2610-2623

Sato Y, Endo H, Okuyama H, Takeda T, Iwahashi H, Imagawa A, Yamagata K, Shimomura I, Inoue M (2011) Cellular hypoxia of pancreatic beta-cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro. *The Journal of biological chemistry* **286**: 12524-12532

Schuler M, Green DR (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society transactions* **29**: 684-688

Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* **21**: 3436-3444

Semenza GL (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in molecular medicine* **7**: 345-350

Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **3**: 721-732

Semenza GL (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2007**: cm8

Semenza GL (2009) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* **24**: 97-106

Semenza GL (2010a) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**: 625-634

Semenza GL (2010b) HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development* **20**: 51-56

Seyfried TN, Shelton LM (2010) Cancer as a metabolic disease. *Nutrition & metabolism* **7**: 7

Shintani Y, Inoue M, Funakoshi Y, Matsumura A, Ohta M, Maeda H, Okumura M (2011) Low dihydropyrimidine dehydrogenase correlates with prolonged survival in patients with lung adenocarcinoma treated with 5-fluorouracil. *Anticancer research* **31**: 4665-4671

Shuvalov O, Petukhov A, Daks A, Fedorova O, Vasileva E, Barlev NA (2017) One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy. *Oncotarget* **8**: 23955-23977

Smith R, Mathis AD, Ventura D, Prince JT (2014) Proteomics, lipidomics, metabolomics: a mass spectrometry tutorial from a computer scientist's point of view. *BMC bioinformatics* **15 Suppl 7**: S9

Smith TG, Brooks JT, Balanos GM, Lappin TR, Layton DM, Leedham DL, Liu C, Maxwell PH, McMullin MF, McNamara CJ, Percy MJ, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Talbot NP, Treacy M, Robbins PA (2006) Mutation of von Hippel-Lindau tumour suppressor and human cardiopulmonary physiology. *PLoS medicine* **3**: e290

Soler-Torronteras R, Lara-Chica M, Garcia V, Calzado MA, Munoz E (2014) Hypoximimetic activity of N-acyl-dopamines. N-arachidonoyl-dopamine stabilizes HIF-1alpha protein through a SIAH2-dependent pathway. *Biochimica et biophysica acta* **1843**: 2730-2743

Song MA, Brasky TM, Marian C, Weng DY, Taslim C, Llanos AA, Dumitrescu RG, Liu Z, Mason JB, Spear SL, Kallakury BV, Freudenheim JL, Shields PG (2016) Genetic

variation in one-carbon metabolism in relation to genome-wide DNA methylation in breast tissue from healthy women. *Carcinogenesis*

Sowter HM, Ferguson M, Pym C, Watson P, Fox SB, Han C, Harris AL (2003) Expression of the cell death genes BNip3 and NIX in ductal carcinoma in situ of the breast; correlation of BNip3 levels with necrosis and grade. *The Journal of pathology* **201**: 573-580

Srinivas V, Zhang LP, Zhu XH, Caro J (1999) Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **260**: 557-561

Stokes RA, Cheng K, Deters N, Lau SM, Hawthorne WJ, O'Connell PJ, Stolp J, Grey S, Loudovaris T, Kay TW, Thomas HE, Gonzalez FJ, Gunton JE (2013) Hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) potentiates beta-cell survival after islet transplantation of human and mouse islets. *Cell transplantation* **22**: 253-266

Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL (2007) Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer metastasis reviews* **26**: 299-310

Tabish SA (2007) Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century? *International journal of health sciences* **1**: V-VIII

Takahashi Y, Takahashi S, Shiga Y, Yoshimi T, Miura T (2000) Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *The Journal of biological chemistry* **275**: 14139-14146

Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan LJ, Nagy A, Fong GH (2006) Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Molecular and cellular biology* **26**: 8336-8346

Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Aminuddin A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K (2016) HIF-1alpha in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. *Diabetes* **65**: 3649-3659

Tandara AA, Mustoe TA (2004) Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World journal of surgery* **28**: 294-300

Taniguchi CM, Finger EC, Krieg AJ, Wu C, Diep AN, LaGory EL, Wei K, McGinnis LM, Yuan J, Kuo CJ, Giaccia AJ (2013) Cross-talk between hypoxia and insulin signaling through Phd3 regulates hepatic glucose and lipid metabolism and ameliorates diabetes. *Nature medicine* **19**: 1325-1330

Tannock IF, Rotin D (1989) Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer research* **49**: 4373-4384

Thangarajah H, Vial IN, Grogan RH, Yao D, Shi Y, Januszyk M, Galiano RD, Chang EI, Galvez MG, Glotzbach JP, Wong VW, Brownlee M, Gurtner GC (2010) HIF-1 α dysfunction in diabetes. *Cell cycle* **9**: 75-79

Thangarajah H, Yao D, Chang EI, Shi Y, Jazayeri L, Vial IN, Galiano RD, Du XL, Grogan R, Galvez MG, Januszyk M, Brownlee M, Gurtner GC (2009) The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 13505-13510

Tian H, Li L, Liu XX, Zhang Y (2006) Antitumor effect of antisense ornithine decarboxylase adenovirus on human lung cancer cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **38**: 410-416

Tibbetts AS, Appling DR (2010) Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annual review of nutrition* **30**: 57-81

Toth A, Kedei N, Wang Y, Blumberg PM (2003) Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. *Life sciences* **73**: 487-498

Vander Heiden MG (2011) Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature reviews Drug discovery* **10**: 671-684

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**: 1029-1033

Volm M, Koomagi R (2000) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer research* **20**: 1527-1533

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995a) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 5510-5514

Wang GL, Jiang BH, Semenza GL (1995b) Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical and biophysical research communications* **216**: 669-675

Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P, Liu Y (2011) Targeting HIF1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell stem cell* **8**: 399-411

Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309-314

Wei K, Pieciewicz SM, McGinnis LM, Taniguchi CM, Wiegand SJ, Anderson K, Chan CW, Mulligan KX, Kuo D, Yuan J, Vallon M, Morton L, Lefai E, Simon MC, Maher JJ, Mithieux G, Rajas F, Annes J, McGuinness OP, Thurston G, Giaccia AJ, Kuo CJ (2013) A liver Hif-2 α -Irs2 pathway sensitizes hepatic insulin signaling and is modulated by Vegf inhibition. *Nature medicine* **19**: 1331-1337

Wells SM, Buford MC, Migliaccio CT, Holian A (2009) Elevated asymmetric dimethylarginine alters lung function and induces collagen deposition in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **40**: 179-188

Wenger RH (2000) Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *The Journal of experimental biology* **203**: 1253-1263

Westhoff M, Litterst P, Freitag L, Urfer W, Bader S, Baumbach JI (2009) Ion mobility spectrometry for the detection of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer: results of a pilot study. *Thorax* **64**: 744-748

Wheatley DN, Campbell E (2002) Arginine catabolism, liver extracts and cancer. *Pathology oncology research : POR* **8**: 18-25

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* **92**: 2260-2268

Wikoff WR, Grapov D, Fahrman JF, DeFelice B, Rom WN, Pass HI, Kim K, Nguyen U, Taylor SL, Gandara DR, Kelly K, Fiehn O, Miyamoto S (2015) Metabolomic markers of altered nucleotide metabolism in early stage adenocarcinoma. *Cancer prevention research* **8**: 410-418

Winter PM, Caruthers SD, Kassner A, Harris TD, Chinen LK, Allen JS, Lacy EK, Zhang H, Robertson JD, Wickline SA, Lanza GM (2003) Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu)beta3-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer research* **63**: 5838-5843

Wojakowska A, Chekan M, Widlak P, Pietrowska M (2015) Application of metabolomics in thyroid cancer research. *International journal of endocrinology* **2015**: 258763

Wojtalla A, Herweck F, Granzow M, Klein S, Trebicka J, Huss S, Lerner R, Lutz B, Schildberg FA, Knolle PA, Sauerbruch T, Singer MV, Zimmer A, Siegmund SV (2012) The endocannabinoid N-arachidonoyl dopamine (NADA) selectively induces oxidative stress-mediated cell death in hepatic stellate cells but not in hepatocytes. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **302**: G873-887

Worley B, Powers R (2013) Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics* **1**: 92-107

Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE, Yin Y (2009) Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids* **37**: 153-168

Xue W, Cai L, Tan Y, Thistlethwaite P, Kang YJ, Li X, Feng W (2010) Cardiac-specific overexpression of HIF-1{alpha} prevents deterioration of glycolytic pathway and cardiac remodeling in streptozotocin-induced diabetic mice. *The American journal of pathology* **177**: 97-105

Yoo JM, Park ES, Kim MR, Sok DE (2013) Inhibitory effect of N-Acyl dopamines on IgE-mediated allergic response in RBL-2H3 cells. *Lipids* **48**: 383-393

- Yoon D, Ponka P, Prchal JT (2011) Hypoxia. 5. Hypoxia and hematopoiesis. *American journal of physiology Cell physiology* **300**: C1215-1222
- Yu J, Shi L, Wang H, Bilan PJ, Yao Z, Samaan MC, He Q, Klip A, Niu W (2011) Conditioned medium from hypoxia-treated adipocytes renders muscle cells insulin resistant. *European journal of cell biology* **90**: 1000-1015
- Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE (2003) Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *The Journal of biological chemistry* **278**: 15911-15916
- Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ (2002) Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Developmental cell* **2**: 331-341
- Zamecnik PC, Lofffield RB, Stephenson ML, Steele JM (1951) Studies on the carbohydrate and protein metabolism of the rat hepatoma. *Cancer research* **11**: 592-602
- Zehetner J, Danzer C, Collins S, Eckhardt K, Gerber PA, Ballschmieter P, Galvanovskis J, Shimomura K, Ashcroft FM, Thorens B, Rorsman P, Krek W (2008) PVHL is a regulator of glucose metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Genes & development* **22**: 3135-3146
- Zhang A, Sun H, Yan G, Wang P, Wang X (2015) Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic. *BioMed research international* **2015**: 354671
- Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL (2007) HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer cell* **11**: 407-420
- Zhang N, Fu Z, Linke S, Chicher J, Gorman JJ, Visk D, Haddad GG, Poellinger L, Peet DJ, Powell F, Johnson RS (2010) The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1 α is an essential regulator of metabolism. *Cell metabolism* **11**: 364-378
- Zhang WC, Shyh-Chang N, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S, Soh BS, Sun LL, Tai BC, Nga ME, Bhakoo KK, Jayapal SR, Nichane M, Yu Q, Ahmed DA, Tan C, Sing WP, Tam J, Thirugananam A, Noghabi MS, Pang YH, Ang HS, Mitchell W, Robson P, Kaldis P, Soo RA, Swarup S, Lim EH, Lim B (2012) Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* **148**: 259-272
- Zhao H, French JB, Fang Y, Benkovic SJ (2013) The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans. *Chemical communications* **49**: 4444-4452
- Zhao YY, Lin RC (2014) UPLC-MS(E) application in disease biomarker discovery: the discoveries in proteomics to metabolomics. *Chemico-biological interactions* **215**: 7-16

Zheng L, Kelly CJ, Colgan SP (2015) Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *American journal of physiology Cell physiology* **309**: C350-360

Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* **455**: 627-632



Effect of *N*-acyl-dopamines on beta cell differentiation and wound healing in diabetic mice

Carla Jiménez-Jiménez^{a,b}, Maribel Lara-Chica^{a,b}, Belén Palomares^{a,b}, Juan Antonio Collado^{a,b}, J. Lopez-Miranda^{a,c}, Eduardo Muñoz^{a,b}, Marco A. Calzado^{a,b,*}

^a Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain

^b Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

^c Unidad de lípidos y aterosclerosis, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Universidad de Córdoba, Ciber Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

N-acyl-dopamines
Hypoxia
HIF-1 α
Beta cells
Wound healing

ABSTRACT

N-acyl-dopamines are endolipids with neuroprotective, antiinflammatory and immunomodulatory properties. Previously, we showed the ability of these compounds to induce HIF-1 α stabilization. Hypoxia and HIF-1 α play an important role in the most relevant stages of diabetic pathogenesis. This work analyzes the possible role of these molecules on beta cell differentiation, insulin production and diabetic foot ulcer. Hypoxia response pathway has been characterized in beta-cell differentiation in rat pancreatic acinar cell line and human islet-derived precursor cells. Protein and mRNA expression of key proteins in this process have been analyzed, as well as those involved in beta cells reprogramming. The effect of *N*-acyl-dopamines on hypoxia response pathway, beta cells reprogramming and insulin production have been studied in both cell types, as well as its role in angiogenesis models in vitro and wound closure in type 2 diabetic mice. Our results show how the hypoxia response pathway is altered during beta cells differentiation, accompanied by an induction of the transcription factor HIF-1 α . We demonstrate how some *N*-acyl-dopamines induce beta cell differentiation and insulin production in two different cell models. In parallel, these endolipids promote angiogenesis in vitro and wound closure in type 2 diabetic mice. These results provide a biological mechanism through which some endolipids could induce beta cell differentiation. We demonstrate how *N*-acyl-dopamines can modulate insulin production and, in parallel, reverse HIF-1 α inhibition in a wound healing model in diabetic mice. Therefore, the potential use of the pharmacological modulation of *N*-acyl-dopamines may have implications for diabetes prevention and treatment strategies.

1. Introduction

N-acyl-dopamines (NADs) are products of long chain fatty acids linked to dopamine at the amino group and members of the endocannabinoids whose physiological role remains uncertain [1]. NADs with residues of arachidonic (*N*-arachidonoyl-dopamine, NADA), oleic (*N*-oleyl-dopamine, OLDA), palmitic (*N*-palmitoyl-dopamine, PALDA) and stearic (*N*-stearoyl-dopamine, STEARDA) acids have been found in the nervous system of different species and in human plasma [2–4]. NADA synthesis takes place through direct conjugation of arachidonic acid with dopamine [5] or tyrosine [6], suggesting the possible existence of other endogenous *N*-acyl-dopamine species. Among them,

NADA and OLDA have attracted special interest because NADA binds to cannabinoid type 1 receptor (CB1) and the transient receptor potential vanilloid type 1 channel (TRPV-1) [2,7,8], and OLDA is a capsaicin-like lipid with full TRPV-1 agonist activity but devoid of affinity for CB receptors [3]. In addition to their ligand activities, other biological properties have been described. For example, NADA induces oxidative stress and apoptosis [9], has neuroprotective and antiinflammatory properties [10,11], and anti-proliferation and immunomodulatory activities [12,13].

Previously, we showed the ability of NADs to induce HIF-1 α stabilization through CB1- and TRPV-1-independent mechanisms [14]. We demonstrate that NADA act as a hypoximimetic agent, and specifically

Abbreviations: T2D, Type 2 Diabetes; EPCs, endothelial progenitor cells; HIF-1 α , Hypoxia-inducible factor 1-alpha; NADA, *N*-arachidonoyl-dopamine; NADs, *N*-acyl-dopamines; OLDA, *N*-oleyl-dopamine; PALDA, *N*-palmitoyl-dopamine; PHDs, prolyl-hydroxylases; SIAH2, E3 ubiquitin-protein ligase; STEARDA, *N*-stearoyl-dopamine

* Corresponding author at: Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain.

E-mail address: mcalzado@uco.es (M.A. Calzado).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.008>

Received 10 May 2018; Received in revised form 12 August 2018; Accepted 14 August 2018

Available online 16 August 2018

0167-4889/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

increase the activity of SIAH2 (seven in absentia homolog 2) enhancing PHD3 degradation and regulating a large number of genes involved in the hypoxia response. In this context, cells adapt through regulation of the HIF-1 α protein level, controlled by hydroxylation on proline 402 and 564 mediated by prolyl-hydroxylases (PHDs) [15]. Under normoxia conditions, hydroxylated HIF-1 α increased its affinity for the tumor-suppressor protein von Hippel-Lindau (VHL), a component of an E3 ubiquitin ligase complex together with elongin B, C and cullin [16], which causes its poly-ubiquitination and degradation by the 26S proteasome [17]. By contrast, in the context of deprivation of oxygen HIF-1 α hydroxylation is reduced because of decreased steady state levels of PHDs, which are controlled by SIAH proteins by poly-ubiquitination and proteosomal degradation [18]. Hypoxia triggers PHD3-SIAH2 association, causing PHDs degradation and subsequent HIF-1 α stabilization. Nowadays there are many proofs of the important role played by HIF-1 α in a wide series of diseases, among which the metabolic syndrome, diabetes, cancer, heart disease and vascular disease are included [19,20].

Diabetes, a health problem of world proportions, has often been associated to new blood vessel formation and other cellular adaptation forms caused by hyperglycemia [21]. However, previous reports show that the control of HIF-1 α levels plays an important role in the most relevant stages of diabetic pathogenesis. Firstly, HIF-1 α factor has a key role in the innate insufficiency of β cells to secrete insulin. It has been demonstrated that in both isolated pancreatic islets of T2D (Type 2 Diabetes) patients and mice models, HIF-1 α levels are inhibited and play a relevant role in beta cells dysfunction [22,23]. Similarly, HIF-1 α factor performs a key role in insulin resistance [24,25], adipocyte dysfunction and inflammation [26,27]. In this sense, in obesity (the main risk factor for suffering from Type 2 Diabetes) there is hypoxia in fat tissue, which is known to produce an important inflammatory response [28,29]. This contributes significantly to pathogenesis of insulin resistance and diabetes. Lastly, studies underline the role played by this transcription factor in vascular problems associated to this disease, which are the final responsible not only of significant morbidity and mortality but also of an important economic cost. Low HIF-1 α levels are the main characteristic behind macro-vascular alterations (coronary and peripheral artery and brain vascular diseases) and micro-vascular alterations (neuropathy, retinopathy, nephropathy). The mechanisms leading to this inhibition are associated to hyperglycemia, as shown in the literature related, which includes a large number of examples where a restoration of HIF-1 α levels leads to a significant improvement of these associated pathologies (heart stroke, diabetic foot, etc.) [30,31]. All these data have arisen a potential interest in the use of HIF-1 α as a therapeutic target in the treatment of diabetes and related complications.

In this report, we demonstrate how the hypoxia response pathway is altered during beta cells differentiation, which is accompanied by an induction of the transcription factors HIF-1 α and HIF-2 α . Furthermore, we show how some endolipids (*N*-acyl-dopamines) present the ability to induce beta cell differentiation in rat pancreatic acinar cell line (AR42J) and human islet-derived precursor cells (hIPCs) through the alteration of this pathway. We present relevant data underlining the ability of NADs to induce insulin production in AR42J and hIPCs. In parallel to this finding, we have analyzed the effect of these endolipids in the context of T2D-associated vascular disease. Initial data set indicates that they are able to induce angiogenesis *in vitro* and wound closure in type II diabetic mice. In summary, this work identifies new biomarkers related to diabetes which could be significant to develop new strategies of prevention and prediction of this relevant global health problem.

2. Methods

2.1. Cell cultures and reagents

Pancreatic acinar-derived AR42J cells were maintained in

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), containing 4.5 g/L of glucose, 0.5 g/L of L-glutamine, supplemented with 10% FBS and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Human islet-derived precursor cells (hIPCs) were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium at the same conditions containing 2 g/L of glucose and 0.3 g/L of L-glutamine. Cell lines were obtained from ATCC (LGC Standards, Teddington, Middlesex, UK) and were routinely tested to be free of mycoplasma and cross contamination. Hypoxia was induced by culture of cells in an Innova Co-48 hypoxia incubator (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) at 1% O₂ concentration. Recombinant human activin A was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Recombinant human hepatocyte growth factor (HGF), NADA, Deferoxamine mesylate salt (DFX) and dopamine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). OLDA and PALDA were from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). STEARDA was from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Stock solution of NADA, OLDA and PALDA (100 μ g/ml, 20 mg/ml and 20 mg/ml, respectively) was prepared in ethanol following the manufacturer's recommendation and stored at -20 °C for no > 2 months. Dopamine and STEARDA, together with the dilutions of the previous NADs, were prepared at the time of use in buffer 1:1 ethanol/PBS 7.2 following the manufacturer's recommendation. In all the experiments control was stimulated with the corresponding vehicle.

2.2. Western blotting and antibodies

Cells were seeded into 6-well plates at medium cell density (2×10^5 cells/well). After 12 h, and with a confluence of 60–75%, the medium was replaced, and the cells stimulated during the time indicated with the different treatments. Protein soluble fractions were obtained after lysis cells in NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol and 1% NP-40) supplemented with 1 mM Na₂VO₄, 10 mM NAF, 1 μ l/ml PMSF saturated, 10 μ g/ml leupeptine, 1 μ g/ml pepstatin and aprotinin. Then proteins were diluted and boiled at 95 °C in SDS buffer, resolved on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels (SDS-PAGE), transferred to PVDF membranes, blocked with non-fat milk in TBTS buffer and incubated with primary antibodies. Secondary antibodies were added and detected by chemiluminescence system. Anti-HIF-1 α (610959) was acquired from BD Biosciences (Madrid, Spain); Anti-SIAH2 (sc-5507), anti-NeuroD (sc-1084), anti-NGN3 (sc-1360002) and anti-PDX1 (sc-25403) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); Anti-AFP (PAS-21004) was from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA); Anti-PHD1 (ab108980), anti-PHD2 (ab109088) and anti-PHD3 were purchased from Abcam (Cambridge, UK) and anti- β -actin (AC-74) was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3. Immunoprecipitation

Cells were collected and washed in PBS by centrifugation and the pellet was lysed in IP Buffer (50 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl and 1% Triton X-100) supplemented with 5 mM EGTA, 20 mM Na₄P₂O₇, 50 mM NaF, 1 mM Na₂VO₄, 2 mM PMSF and 10 μ g/ml of aprotinin, pepstatin and leupeptine. Cell lysates were incubated with 1 μ g of the indicated antibodies for 7 h at 4 °C. Antibodies were then isolated with 50 μ l of protein A/G Sepharose (sc-2003, Santa Cruz). Immunoprecipitated proteins were eluted in 1 \times SDS sample buffer and immunoblotted as described before.

2.4. RNA extraction and qRT-PCR

Cells were collected in PBS and total RNA was extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was executed with the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Madrid, Spain). RT-PCR was

employed with GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA) in an iCYCLER detection system (Bio-Rad). The amplification profile consisted of an initial denaturation for 5 min at 95 °C and then 40 cycles of 30 s at 95 °C, annealing for 30 s at 60 °C, and elongation for 30 s at 72 °C. A cycle of 10 s at 83 °C and a final extension for 1 min was carried out at 72 °C. Amplification efficiencies were validated and normalized against GAPDH or β -actin, and fold change in gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The primers used in this study were:

2.7. Animals

Male 8-week-old diabetic db/db (BKS(D)-Lepr db/dbJorIRj mice and their normoglycemic heterozygous (BKS(D)-Lepr db/+JorIRj) were obtained from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Animals were caged individually in a 12 h light/dark cycle at 20 °C (± 2 °C) with 40–50% relative humidity and provided with standard food and water. These experiments were made according to European

Genes	Forward	Reverse
<i>hHIF-1α</i>	5'-GAAAGCGCAAGTCTTCAAAG-3'	5'-TGGGTAGGAGATGGAGATGC-3'
<i>rHIF-1α</i>	5'-GTTTACTAAAGGACAAAGTACC-3'	5'-TTCGTGTTTGTGAAGGGAG-3'
<i>mHIF-1α</i>	5'-CCTGCACTGAATCAAGAGGTTGC-3'	5'-CCATCAGAAGGACTTGCTGGCT-3'
<i>hSIAH2</i>	5'-CTATGGAGAAGGTGGCCTCG-3'	5'-CGTATGGTGCAGGGTCAGG-3'
<i>rSIAH2</i>	5'-CGCCAGAAGTTGAGCTGCT-3'	5'-TGGTGGCATACTTACAGGGAA-3'
<i>mSIAH2</i>	5'-GTATGCTACCACGGGCTGTT-3'	5'-ATGCATGAGATGGGACATCA-3'
<i>hPHD1</i>	5'-TATGCCACCAGGTACGCCATC-3'	5'-AGGAGCAGCCAGCACAGG-3'
<i>rPHD1</i>	5'-CTGGGCAACTACGTATCAAT-3'	5'-TGCACTTAACATCCCAGTTC-3'
<i>mPHD1</i>	5'-ATGGCTCACGTGGACGCAGTAA-3'	5'-CATTGCTGGATAACACGGCCAC-3'
<i>hPHD2</i>	5'-GGACGACCTGATACG-3'	5'-ACTTACCTTGGCATCC-3'
<i>rPHD2</i>	5'-CTGGGCAACTACGTATCAAT-3'	5'-TGCACTTAACATCCCAGTTC-3'
<i>mPHD2</i>	5'-TAAACGGCCGAACGAAAGC-3'	5'-GGGTATCAACGTGACGGACA-3'
<i>hPHD3</i>	5'-CCTCTTACGCAACAGATATG-3'	5'-AGCACGGTCAGTCTTCAG-3'
<i>rPHD3</i>	5'-GAGGCCAAGTTACATG-3'	5'-GGGCTCCACGTCTGTACAA-3'
<i>mPHD3</i>	5'-CTATGTCAAGGAGCGGTCCAA-3'	5'-GTCCACATGGCGAACATAACC-3'
<i>hINSULIN</i>	5'-TGTCCTTCTGCCATGGCCCT-3'	5'-TTCACAAAGGCTGCGCTGG-3'
<i>rINSULIN</i>	5'-CCCCAGTGTCCCCATCCT-3'	5'-TTTCCTGAGAGAGAGCTTTTCCA-3'
<i>mSDF1</i>	5'-CAGAGCCAACGTCAAGCA-3'	5'-AGGTACTCTTGGATCCAC-3'
<i>mVEGFA</i>	5'-CATCTTCAAGCCGCTGTGT-3'	5'-CAGGGCTTCATCGTTACAGCA-3'
<i>mCOL1A2</i>	5'-CCGTGCTTCTCAGAACATCA-3'	5'-CTTGCCCCATTCAATTGTCT-3'
<i>hHPRT</i>	5'-ATGGGAGGCCATCACATTGT-3'	5'-ATGTAATCCAGCAGGTACAGAA-3'
<i>rGADPH</i>	5'-TTCAACGGCACAGTCAAGGC-3'	5'-TCACCCCATTTGATGTTAGCG-3'
<i>mGADPH</i>	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTGCC-3'	5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCC-3'

2.5. Serum insulin assay

After stimulation, AR42J cells were washed and incubated with 1.5 mL of Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRBB) containing 143.5 mM NaCl, 5.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 25 mM HCO₃, 0.3% BSA (Sigma) and 3.3 mM glucose at 37 °C for 1 h. Then, cells were washed and incubated with 1.5 mL KRBB buffer with 27.7 mM glucose at 37 °C for 1 h. The supernatant was stored at -20 °C until required for insulin detection by ELISA. Total insulin was measured in hIPCs or AR42J serum by human (10-1113-01) or rat (10-1250-01) ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Sweden) respectively.

2.6. In vitro angiogenesis assay

PrimeKit cryo (Essen Biosciences #4452 Ann Arbor, MI, USA) was used to perform the angiogenesis assay with Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) cells. Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) were seeded in a 96-well plate and co-cultured with HUVEC Cytolight Green cells. After 12 h cells were treated with EGF (10 ng/mL) or increasing concentrations of STEARDA or PALDA for 48 h. Tube formation was studied in real time using Incucyte™ ZOOM Live-Cell Imaging System (Essen Bioscience, Hertfordshire, UK).

Union guideline and approved by the Animal Research Ethic Committee of Córdoba University (2014PI/024).

2.8. Wound healing model

Mice were anesthetized with 3% isoflurane (Fatro, Barcelona, Spain). Back hair was shaved with a depilatory cream and then with an electric razor. Skin was cleansed with alcohol and two wounds were made through the fleshy panicle on the back on each side of the midline using a 6 mm biopsy punch. A transparent bandage (Tegaderm; 3 M) was used to cover the wounds after the atopic application of the indicated treatments, which were applied using a 30-gauge needle every two days. Each treatment was analyzed in 6 animals per group. Tissue samples were collected 14 days after surgery for histology and to analyze mRNA or protein expression.

2.9. Analysis of wounds

Digital photographs were taken the day of the surgery and every other day after the wound during the 14 days. A circular reference was used to correct the distance between the camera and the animals. The area of the wound was calculated in pixels with the ImageJ 1.32 software (National Institutes of Health), using the circle as a reference to

correct the area of the wound and thus express it as a percentage of the original area.

2.10. Histology and immunohistochemistry

Wound tissues were processed into paraffin and sections of 5 μ m stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome and visualized under light at magnification $\times 10$. We used a semi-quantitative score to evaluate epidermal regeneration, granulation and new collagen as previously described [32,33]. Stained sections were scored using a three-point scale to evaluate re-epithelization (1, little regeneration; 2, moderate regeneration; and 3 complete regeneration), a four-point scale to evaluate granulation tissue formation (1, thin granulation layer; 2, moderate granulation layer; 3, thick granulation layer; and 4, very thick granulation layer) and a five-point scale to evaluate new collagen (0, absent; 1, minimal-GT; 2, mild-GT; 3, moderate-GT; 4, marked-GT). For immunohistochemical analysis, 5 μ m paraffin sections were deparaffined, rehydrated and immersed in antigen retrieval solution (10 mM sodium citrate buffer, pH 6) at 95 °C for 10 min. Endogenous peroxidase was quenched with 3% hydrogen peroxide for 30 min at room temperature and sections were blocked in normal goat serum (20773, Merck Millipore) for 30 min at room temperature and incubated with anti-CD31 antibody (ab28364) (1:100; Abcam) overnight at 4 °C. Then, the slides were incubated for 1 h at room temperature with biotinylated goat-anti-rabbit secondary antibody (21537, Merck Millipore). Reaction was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (71897 + 71898, Merck Millipore). The slides were then counterstained with hematoxylin, followed by dehydration and mounting. Vascular density was assessed by counting vessels per field of stained sections at $40\times$. All slides were evaluated in a blinded manner by two independent observers using six stained sections (at least three fields from each section) of each group. A Leica DM2500 microscope and a Leica DFC420c camera were used for slide observation and photography.

2.11. Endothelial progenitor cells (EPCs) analysis

Peripheral blood was drawn from a cardiac puncture into a 1-ml syringe containing 5 mM EDTA (E7889, Sigma-Aldrich). Red blood cells (RBCs) were lysed by $1\times$ RBC Lysing Buffer (555899, BD Biosciences) and washed 3 times (1700 rpm, 5 min, 4 °C) in cold wash buffer (PBS/0.1% N_aN_3 /1% FBS). Then, 1×10^6 cells were resuspended in 100 μ l cold wash buffer, incubated with FITC-conjugated Sca-1 (557405, BD Biosciences), PE-conjugated Flk-1 (561052, BD Bioscience), FITC-conjugated IgG_{2a}, κ isotype control (562058, BD Biosciences), PE-conjugated IgG_{2a}, κ isotype control (557076, BD Biosciences) in the dark for 30 min on ice protected from light. Then, cells were subsequently washed twice in cold wash buffer and fixed in BD CellFix (340181, BD Biosciences). Dead cells were excluded with fixable viability stain 780 labelling of cells (565388, BD Biosciences). Finally, Sca-1⁺/Flk-1⁺ cells were analyzed with a BD LSRFortessa™ flow cytometer and FACSDiva software (BD Biosciences). Each analysis included at least 50,000 events.

2.12. Statistical analysis

In vitro data were expressed as mean \pm S.D. and in vivo results were represented as mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by the Dunnett's post hoc tests or unpaired two-tailed Student's *t*-test were used to determine the statistical significance. *P* < 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® version 6.01. Images were evaluated and quantified using the Image J.

3. Results

3.1. Characterization of hypoxia response pathway in cellular differentiation of pancreatic AR42J cells with activin A and HGF

In order to investigate the effect of NADs on the differentiation to beta cells, we analyzed firstly the expression of key proteins involved in the hypoxia response pathway in the AR42J cell model [34]. AR42J cells were differentiated into insulin-producing beta cells by stimulation with activin A and HGF, and their morphology and insulin secretion analyzed. As shown in Fig. 1A, AR42J cells presented significant morphology changes by extending neurites, which were accompanied by a higher insulin secretion and a significant increase in the gene insulin expression (Fig. 1A). In parallel, we analyzed the expression of proteins involved in beta cells reprogramming such as AFP, NeuroD, PDX1 and Ngn3. As shown in Fig. 1B, we observed a clear increase in the expression level of these proteins after stimulation (Fig. 1B). Next, we analyzed the mRNA and protein expression levels of key players in the hypoxia response pathway, such as HIF-1 α , SIAH2 and prolyl hydroxylases (PHD1, PHD2, PHD3). Significant changes in the mRNA expression of SIAH2, PHD1, PHD2, PHD3 were detected (Fig. 1C), which were not accompanied by changes at the protein level. However, and as depicted in Fig. 1C, stimulation with activin A and HGF was able to induce HIF-1 α protein.

3.2. N-acyl-dopamines induce HIF-1 α expression in AR42J cells during beta cell differentiation

Next, we decided to study the effect of HIF-1 α induction on the differentiation to insulin-producing beta cells in the AR42J cell model. Cells were subjected to hypoxia (1% O₂), stimulated with Deferoxamine (DFX, hypoxia-mimetic agent used to stabilize HIF-1 α through the inhibition of PHDs), or treated with different NADs [NADA (N), OLDA (O), STEARDA (S), PALDA (P)], using dopamine (D) as a negative control. As shown in Fig. 2A, the expression of proteins involved in beta cells reprogramming (AFP, NeuroD, PDX1 and Ngn3) was induced in response to Hypoxia, DFX, and NADs. Nevertheless, AFP expression was not significantly affected in response to STEARDA (S) and PALDA (P). In parallel, we analyzed mRNA and protein expression levels of key players in the hypoxia response pathway (HIF-1 α , SIAH2, PHD1, PHD2, PHD3) (Fig. 2B and C). These experiments revealed that NADs induced HIF-1 α expression at the protein and mRNA level in the same way as the exposure to low levels of O₂ (1%) or DFX, being STEARDA (S) and PALDA (P) the best activators. Regarding SIAH2, an increase in the mRNA expression was detected in response to activin A + HGF and NADs, whereas all the stimuli presented a clear induction at the protein level except for activin A + HGF, STEARDA (S) and PALDA (P). Regarding PHDs expression, PHD2 and PHD3 down-regulation at mRNA levels was detected in response to NADs and hypoxia, and only after stimulation with PALDA for PHD1. By contrast, protein levels did not show significant changes with any of the treatments (Fig. 2B and C). This could be due to a self-regulation mechanism of the mRNA levels mediated by HIF-1 α , together with the lack of effect of NADs on PHDs protein expression. Finally, we analyzed insulin secretion in response to these stimuli. As shown in Fig. 2D, AR42J cells were converted into insulin-producing cells in response to the different treatments, among which stimulus with dopamine was the least significant. Collectively, these experiments reinforce the idea that HIF-1 α levels play a relevant role in beta cells dysfunction, and also how induction both at protein and mRNA level mediated by NADs could participate, at least partly, on cell differentiation of pancreatic AR42J cells to insulin-producing beta cells.

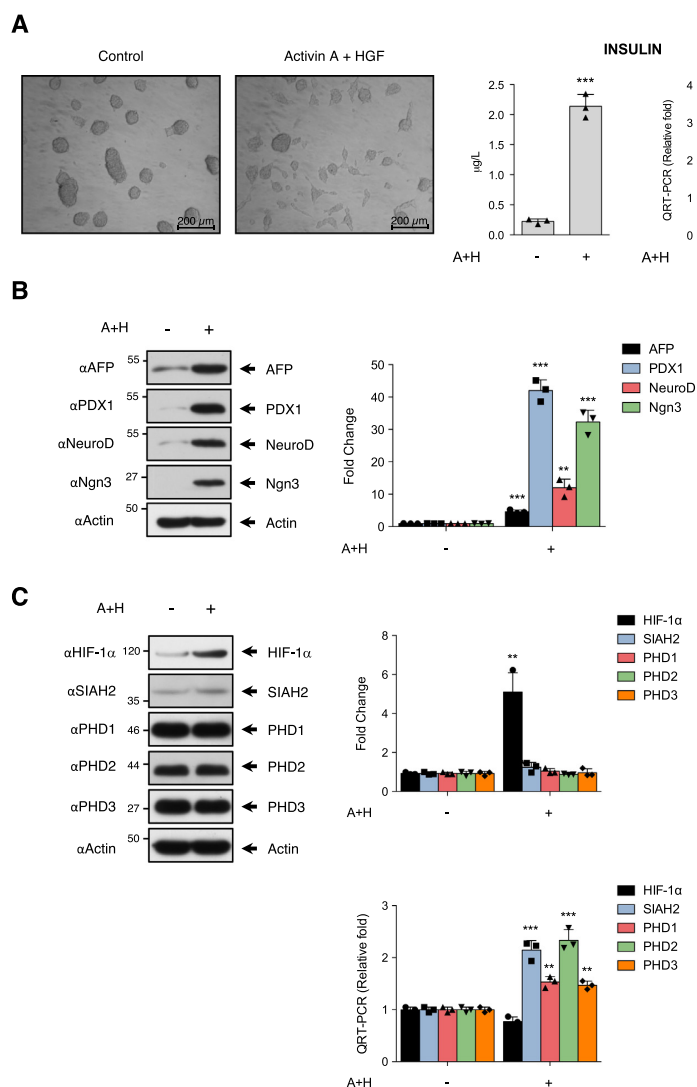


Fig. 1. Characterization of hypoxia response pathway in cellular differentiation of pancreatic AR42J cells. (A) AR42J cells were stimulated with activin A (2 nM) and hepatocyte growth factor (HGF) (100 nM) for 48 h, where the morphology and insulin production of these cells were analyzed by ELISA and PCR to measure the levels of protein and mRNA, respectively. Data are mean \pm SD of $n = 3$ experiments. *** $P < 0.001$ vs. control group and ** $P < 0.01$ vs. control group (unpaired two-tailed Student's t -test). (B) Cells were differentiated or not, lysed and evaluated for endogenous protein (AFP, PDX1, NeuroD and Ngn3). We show a representative western blot of three independent experiments (left side) and quantification (right side). Data are mean \pm SD of $n = 3$ experiments. *** $P < 0.001$ vs. control group and ** $P < 0.01$ vs. control group (unpaired two-tailed Student's t -test). (C) Cells were differentiated and the protein expression was evaluated by immunoblotting with the indicated antibodies. We show a representative western blot of three independent experiments (left side) and quantification (right side). In the same samples, gene expression was analyzed by qRT-PCR. Data are mean \pm SD of $n = 3$ experiments. ** $P < 0.01$ vs. control group and *** $P < 0.001$ vs. control group (unpaired two-tailed Student's t -test).

3.3. *N*-acyl-dopamines induce HIF-1 α expression in Human Pancreatic hIPCs cells during beta cell differentiation

To confirm the NADs capacity to induce HIF-1 α expression and differentiation to insulin-producing beta cells, we repeated the same experiments in human IPCs cell line. Cells were subjected to hypoxia (1% O₂), DFX or different NADs. As shown in Fig. 3A, and as we observed in AR42J cells (Fig. 3A), the expression of AFP, NeuroD, PDX1 and Ngn3 was induced in response to hypoxia, DFX and NADs. AFP expression was less intense in response to STEARDA (S) and PALDA (P). Next, we analyzed mRNA and protein expression levels of HIF-1 α , SIAH2, PHD1, PHD2 and PHD3 (Fig. 3B and C). NADs induced HIF-1 α expression at the protein and mRNA level in a manner similar to DFX and no significant changes were noted in response to PALDA (P) in this cell line. We also observed a clear induction of HIF-1 α (protein and mRNA level) in response to hypoxia and DFX. SIAH2 protein level was partially inhibited in response to OLDA (O), PALDA (P) and dopamine (D), without detecting significant changes to mRNA level. PHD1, PHD2, PHD3 protein levels did not show significant changes with any of the

treatments (Fig. 3C). At the mRNA levels, in general no relevant changes were detected, except for PHD2 levels which showed a significant induction with all treatments except for PALDA (P). Finally, we analyzed insulin secretion in response to these stimuli (Fig. 3D). As observed with AR42J cells, hIPCs cells were converted into insulin-producing cells in response to the different treatments. Altogether, these results strengthen the idea that HIF-1 α induction in response to stimuli such as hypoxia or *N*-acyl-dopamine could play an important role on cell differentiation and insulin secretion.

3.4. STEARDA and PALDA induce HIF-2 α and promote angiogenesis in vitro

Next, we decided to investigate the effect of NADs on HIF-2 α expression level. STEARDA and PALDA were selected because of their higher ability to induce HIF-1 α shown in previous experiments (Figs. 2B and 3B). HIF-2 α is the second major HIF isoform that regulates numerous genes involved in glucose metabolism and angiogenesis [35,36]. Previous studies have shown that the activation of hepatic HIF-

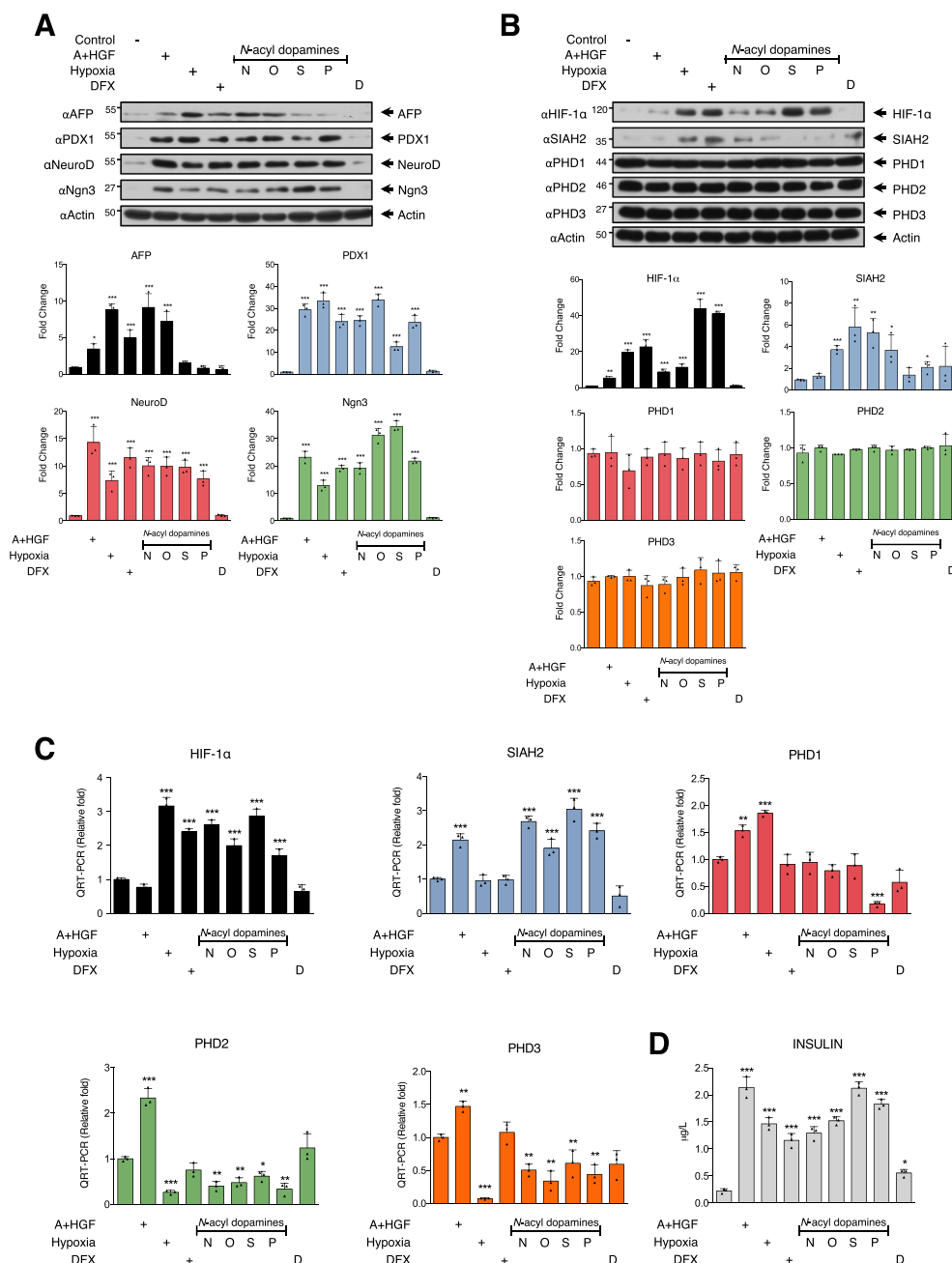


Fig. 2. *N*-acyl-dopamines induce HIF-1 α in AR42J cells during beta cell differentiation. AR42J cells were differentiated or not, subjected to hypoxia (1% O₂) for 12 h, or stimulated with DFX (10 μ M) or NADA (N) (10 μ M), OLDA (O) (10 μ M), STEARDA (S) (10 μ M), PALDA (P) (10 μ M) or Dopamine (D) for 48 h, respectively. Cell lysates were analyzed for protein expression by immunoblots (A–B). We show a representative western blot of three independent experiments (upper panel) and quantification (lower panel). In the same samples gene expression was analyzed by qRT-PCR (C). Data are mean \pm SD of $n = 3$ experiments. * $P < 0.05$ vs. control group, ** $P < 0.01$ vs. control group and *** $P < 0.001$ vs. control group (one-way ANOVA followed Dunnett's test). (D) AR42J cells were seeded in 24 mm transwell plates, stimulated with the same treatments and incubated with KRBB supplemented with 27.7 mM glucose for 1 h. Insulin secretion was analyzed by ELISA. Data are mean \pm SD of $n = 3$ experiments. * $P < 0.05$ vs. control group, *** $P < 0.001$ vs. control group (one-way ANOVA followed Dunnett's test).

2 α improves glucose homeostasis and increases insulin sensitivity by stabilizing the signaling pathway of the insulin receptor substrate (IR-S2)–AKT [37]. Recently, it has been shown that HIF-2 α is essential for the acute postprandial regulation of hepatic glucagon signaling,

pointing out this transcription factor as a potential therapeutic target in the treatment of diabetes [38]. In Fig. 4 it is shown that both STEARDA and PALDA induced HIF-2 α expression at the protein level to the same extent as exposure to DFX or activin A + HGF stimulation in AR42J

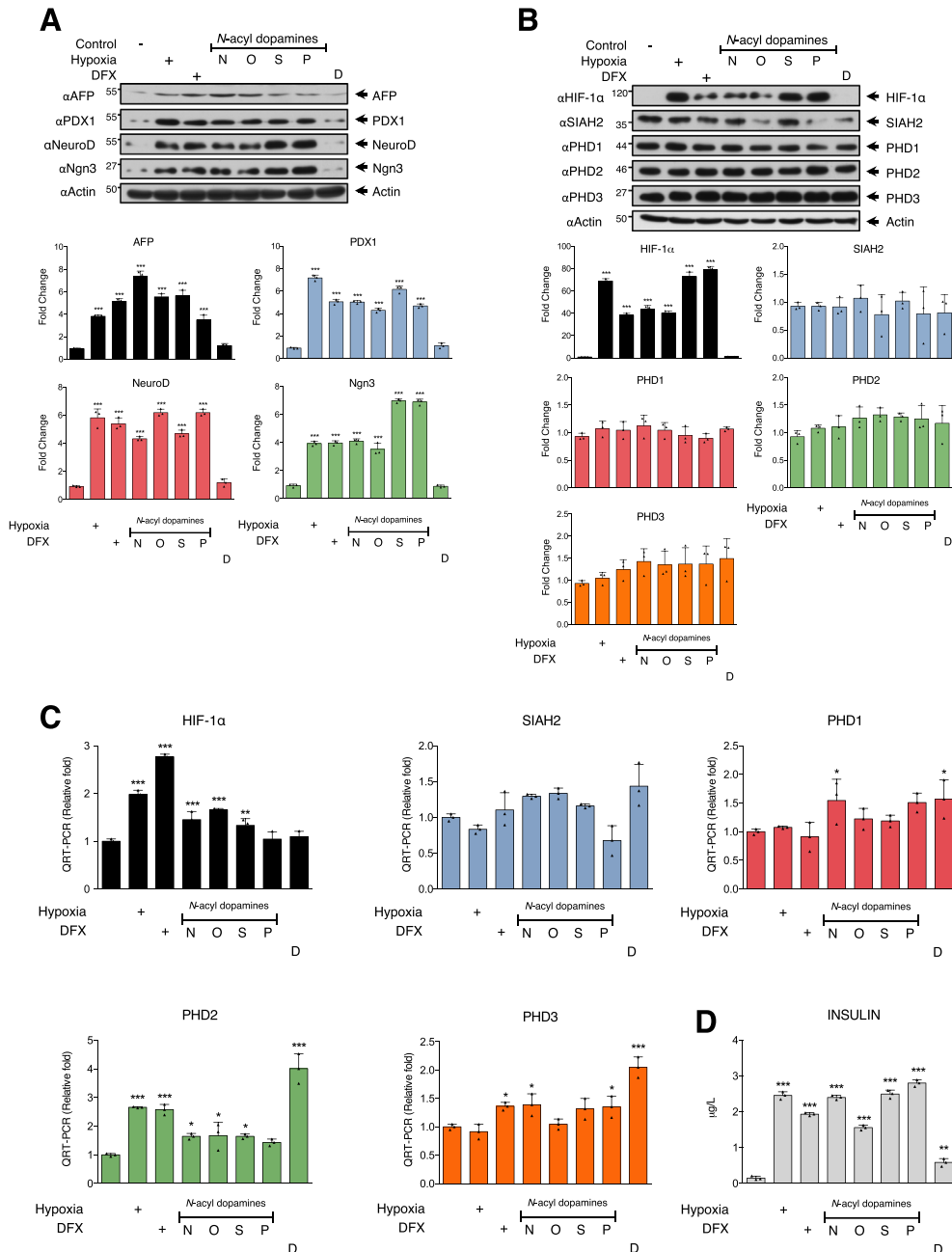


Fig. 3. *N*-acyl-dopamines induce HIF-1α in Human Pancreatic hIPCs cells during beta cell differentiation. hIPCs cells were differentiated or not, subjected to hypoxia (1% O₂) for 12 h, or stimulated with DFX (10 μM) or NADA (N) (10 μM), OLDA (O) (10 μM), STEARDA (S) (10 μM), PALDA (P) (10 μM) or dopamine (D) for 48 h, respectively. Cells were harvested and one aliquot was analyzed for the levels of the indicated proteins by immunoblot (A–B) while another aliquot was analyzed by qPCR to measure mRNA levels (C). We show a representative western blot of three independent experiments (upper panel) and quantification (lower panel). Data are mean ± SD of n = 3 experiments. **P* < 0.05 vs. control group, ***P* < 0.01 vs. control group and ****P* < 0.001 vs. control group (one-way ANOVA followed Dunnett's test). (D) hIPCs cells were seeded in 24 mm transwell plates and stimulated with the indicated treatments. Insulin secretion was analyzed by ELISA. Data are mean ± SD of n = 3 experiments. ***P* < 0.01 vs. control group and ****P* < 0.001 vs. control group (one-way ANOVA followed Dunnett's test).

(Fig. 4A) and hIPCs cells (Fig. 4B). Next, and to determine initially the consequences of HIF-1α and HIF-2α induction mediated by STEARDA and PALDA, we decided to study its effect on formation of new blood vessels. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) co-cultured

with Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) were stimulated with STEARDA and PALDA and tubulogenesis quantified in real time using Incucyte ZOOM Live-Cell Imaging System. RhEGF was used as a positive control for this experiment (Fig. 4C). STEARDA and PALDA

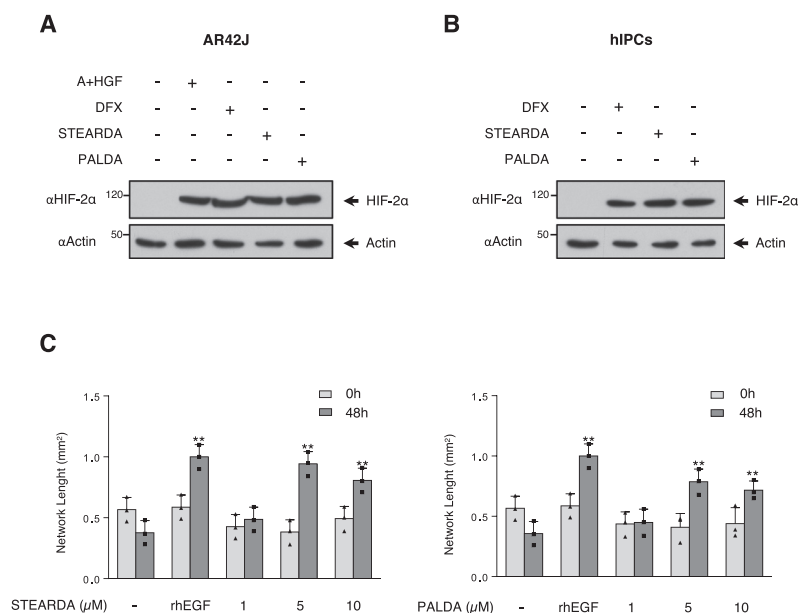


Fig. 4. STEARDA and PALDA induce HIF-2 α in AR42J and hIPCs and promote angiogenesis in vitro. (A) AR42J cells were differentiated or not, and together with hIPCs cells (B) stimulated with DFX (10 μ M), STEARDA (10 μ M) or PALDA (10 μ M) for 48 h. Cells were lysed and HIF-2 α endogenous protein levels evaluated by western blot with the specific antibody. We show a representative western blot of three independent experiments. (C) Normal Human Dermal Fibroblasts and HUVEC were seeded and incubated with the indicated concentrations of STEARDA or PALDA for 48 h. rhEGF (10 ng/mL) was used as the positive control. Screening for enhanced HUVEC tube formation was performed in vitro after treatment with or without the endolipids. Data are mean \pm SD of $n = 3$ experiments. ** $P < 0.01$ vs. control group. We show a representative western blot of three independent experiments (unpaired two-tailed Student's t -test).

stimulation with different concentrations resulted in an increase in the formation of tube-like structures. We observed an increase in cell death after stimulus with PALDA at the highest concentration (10 μ M).

3.5. Wound closure effect of *N*-acyl-dopamines in type II diabetic mice

Among the various complications associated to Diabetes, diabetic foot ulcer constitutes the most prevalent disorder and leads to delayed wound healing [39]. Next, we investigated the effects of NADs in a wound healing mouse model of type II diabetes. As shown in Fig. 5A, animals treated with STEARDA and PALDA showed enhanced wound healing capacity after day 14, as compared to those not treated or treated with DFX. Histological analysis showed that stimuli with STEARDA or PALDA improved wound healing in diabetic mice. To study re-epithelialization and granulation of the wound, we performed a staining with H&E. The epithelial layers in the mice treated with 150 μ M of STEARDA and PALDA presented a score of 2.2 compared to the untreated db/db mice with a score of 0.98. The mice treated with DFX (positive control) have a score of 2.97 and the db/+ mice have a score of 2.8. As for granulation, mice treated with 150 μ M of STEARDA and PALDA presented a score of 2 and 3, respectively, compared to untreated db/db mice with a score of 2.98. DFX-treated mice (positive control) had a score of 0.97 and the db/+ mice had a score of 2.

To analyze the nature of the wound healing, the deposition of collagen was evaluated right at the wound site by MT staining. Mice treated with 150 μ M of STEARDA and PALDA present a score of 3 and 2.75, respectively, compared to untreated db/db mice with a score of 1.33. The mice treated with DFX (positive control) have a score of 4 and the db/+ mice have a score of 3.67. To study angiogenesis, CD31 immunostaining was performed. Mice treated with 150 μ M of STEARDA and PALDA have a score of 26 vessels per field, respectively, compared to untreated db/db mice with a score of 4 vessels/field. Mice treated with DFX (positive control) have a score of 11 vessels per field and db/+ mice have a score of 6 vessels/field (Fig. 5B).

3.6. Induction of the hypoxia response pathway activates various processes involved in wound healing

Then, and based on the previous experiments, we decided to

investigate the effect of NADs on the mRNA and protein expression levels of key proteins in the hypoxia response pathway in wound tissues. As shown in Fig. 6A, HIF-1 α protein expression was inhibited in these diabetic mice compared to db/+ mice. However, when db/db mice were treated with 150 μ M of STEARDA, PALDA or DFX, this inhibition was reversed and the HIF-1 α protein returned to normal values presented by control mice. Regarding the PHDs, none presented changes between treated and untreated db/db mice and control mice (Fig. 6A and Supplementary Fig. 1). The levels of mRNA expression for HIF-1 α and SIAH2 were higher in the treated db/db mice than in those without treatment, reaching higher levels of these genes even compared with the db/+ control mice (Fig. 6B). PHD1 mRNA levels expression in untreated db/db mice was inhibited compared to control mice, and db/db mice treated with STEARDA showed a reversal of this inhibition. PHD2 and PHD3 expression levels in untreated db/db mice were activated as compared to the db/+ mice. However, the treated db/db mice had levels of these genes similar to those present in control mice (Fig. 6B).

Next, we decided to study HIF-1 α target genes involved in vessel development (VEGF-A and SDF-1 α) or collagen production (COL1A2). As shown in Fig. 6C, SDF-1 α , VEGF-A and COL1A2 mRNA levels were inhibited in untreated db/db mice, an effect that was reversed when these mice were treated with STEARDA, PALDA or DFX. Finally, we decided to analyze the levels of EPCs (endothelial progenitor cells) in peripheral blood mononuclear cells isolated from control group (db/+) and type II diabetic (db/db) mice, untreated or treated with DFX, STEARDA, PALDA (Fig. 7A). Results showed a 91% decrease in circulating EPCs in diabetic mice with respect to control group (db/+). This effect was partially reversed when the diabetic mice were treated with STEARDA, PALDA or DFX (positive control).

4. Discussion

Hypoxia response pathway is involved in the pathophysiology of various diseases such as metabolic syndrome, cancer, pulmonary vascular diseases, cardiovascular diseases and diabetes [19,20]. Diabetes has become the most common chronic disease and one of the world's major causes of death in most developed countries. Previous reports have shown that deregulation of HIF pathway is usually coupled to

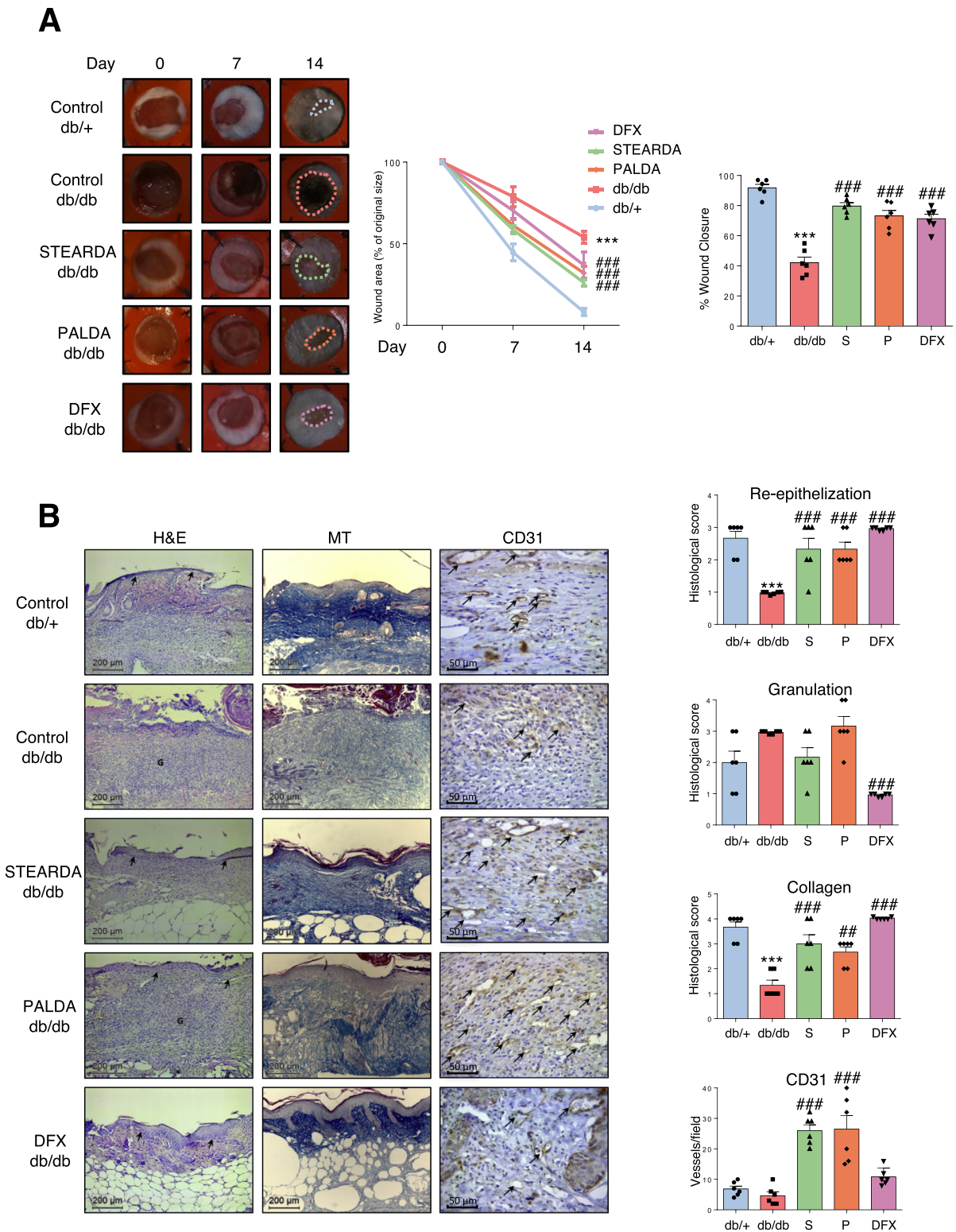


Fig. 5. Wound healing effect of STEARDA and PALDA in type II diabetic mice. (A) Mice were divided into 5 groups. One group of control mice (db/+) and another control group of diabetic mice (db/db) treated topically with vehicle (10% DMSO, 10% Propylene glycol, 80% saline), two other groups of db/db mice treated topically with 150 μ M STEARDA or PALDA, respectively. The fifth group of db/db mice was stimulated topically with 1 mM of DFX, used as a positive control. The wounds were photographed on days 0, 3, 7, 10, 14. A quantitative analysis of the wound area was performed on days 0, 7, 14 and the percentage of wound closure on day 14. Data are mean \pm SEM. *** P < 0.001 db/db control vs. db/+ control group. ### P < 0.001 db/db treated with DFX, STEARDA or PALDA vs. db/db control (one-way ANOVA followed Dunnett's test). (B) Tissue samples were stained with H&E or with MT or with CD31 on day 14, respectively. The criteria to evaluate the histological score of wound healing was as follows: re-epithelialization (1 \pm : Little epidermal and dermal organization, 2 \pm : Moderate epidermal and dermal organization, 3 \pm : Complete remodeling of epidermis and dermis), granulation (1 \pm : Thin granulation layer, 2 \pm : Moderate granulation layer, 3 \pm : Thick granulation layer, 4 \pm : Very thick granulation layer), collagen (0: Absent, 1: Minimal-GT (Granulation tissue), 2: Mild-GT, 3: Moderate-GT, 4: Marked-GT), angiogenesis (1 \pm : Altered angiogenesis (1–2 vessels per site), 2 \pm : Few newly formed capillary vessels (3–4 per site), 3 \pm : Newly-formed capillary vessels (5–6 per site), 4 \pm : Newly-formed and well-structured capillary vessels (> 7 per site)). The images were quantified using the ImageJ software. Data are mean \pm SEM. *** P < 0.001 db/db control vs. db/+ control group. ## P < 0.01 db/db treated vs. db/db control. ### P < 0.001 db/db treated vs. db/db control (one-way ANOVA followed Dunnett's test).

harmful effects in diabetic pathogenesis such as pancreatic beta cells malfunction for insulin secretion [22,40], inflammation and dysfunction of adipocytes [26,27] and insulin resistance [24,25]. All these data have arisen a potential interest in the use of HIF-1 α as a therapeutic target in the treatment of diabetes and related complications. Although the specific manipulation of HIF-1 α levels is complex and difficult to be performed in specific tissues, there are positive data supporting this novel approach. In this sense, the use of iron chelates provokes an

increase in HIF-1 α levels, since the hydrolases in charge of its degradation need this metal. Thus, the use of compounds such as DFO (Deferoxamine) demonstrates the improvement in the insulin function and secretion in islets from Type 2 Diabetes patients [22], as well as a larger tolerance to glucose in mice subjected to a high-fat diet [41]. In the same sense, it has been shown how the use of these compounds produce clear effects on vascularization and healing improvement [30,31], effects associated to an increase in HIF-1 α levels. Therefore,

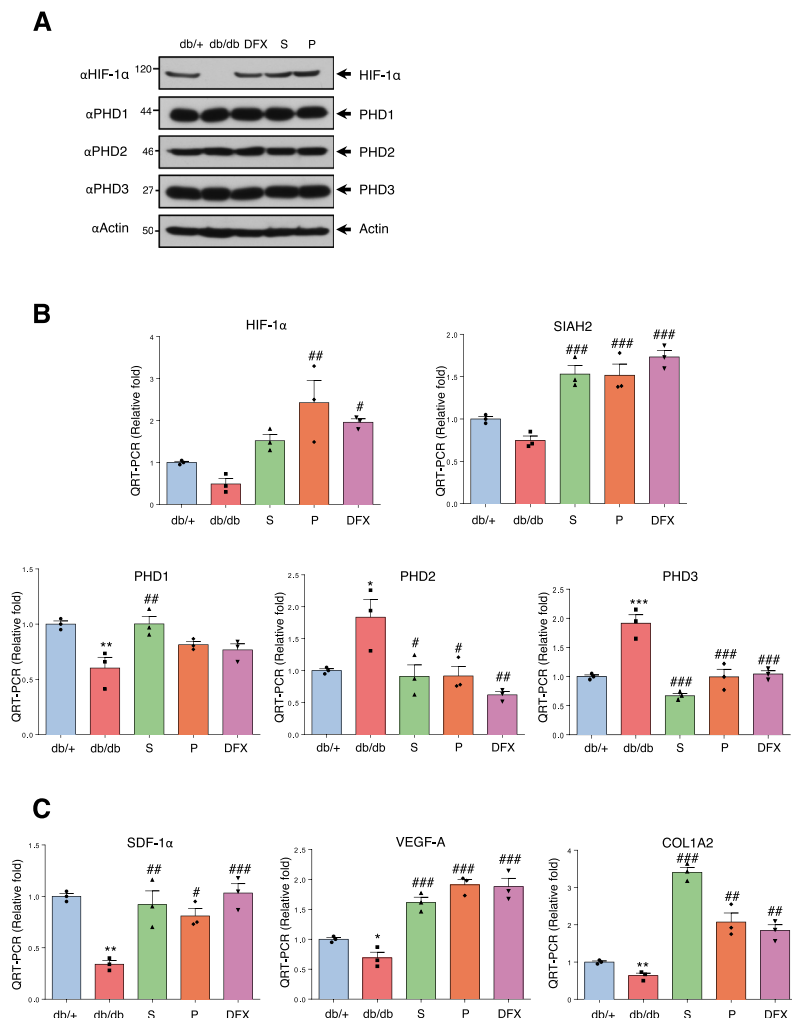


Fig. 6. Induction of the hypoxia response pathway activates various processes involved in wound healing. (A) From the wounds healing obtained from the mice mentioned above, proteins were extracted to analyze endogenous levels of the indicated proteins by immunoblot. We show a representative western blot of six independent experiments. Quantification is shown in Supplementary Fig. 1. (B) Another aliquot was analyzed by qPCR to measure mRNA levels. Data are mean \pm SEM of n = 3 experiments. ** P < 0.01 db/db control vs. db/+ control group. # P < 0.05 db/db treated vs. db/db control. ## P < 0.01 db/db treated vs. db/db control. ### P < 0.001 db/db treated vs. db/db control (one-way ANOVA followed Dunnett's test). (C) RNA was extracted from these wounds to study the mRNA levels of SDF-1 α , VEGF-A and COL1A2. Data are mean \pm SEM of n = 3 experiments. * P < 0.05 and ** P < 0.01 db/db control vs. db/+ control group. # P < 0.05 db/db treated vs. db/db control. ## P < 0.01 db/db treated vs. db/db control. ### P < 0.001 db/db treated vs. db/db control (one-way ANOVA followed Dunnett's test).

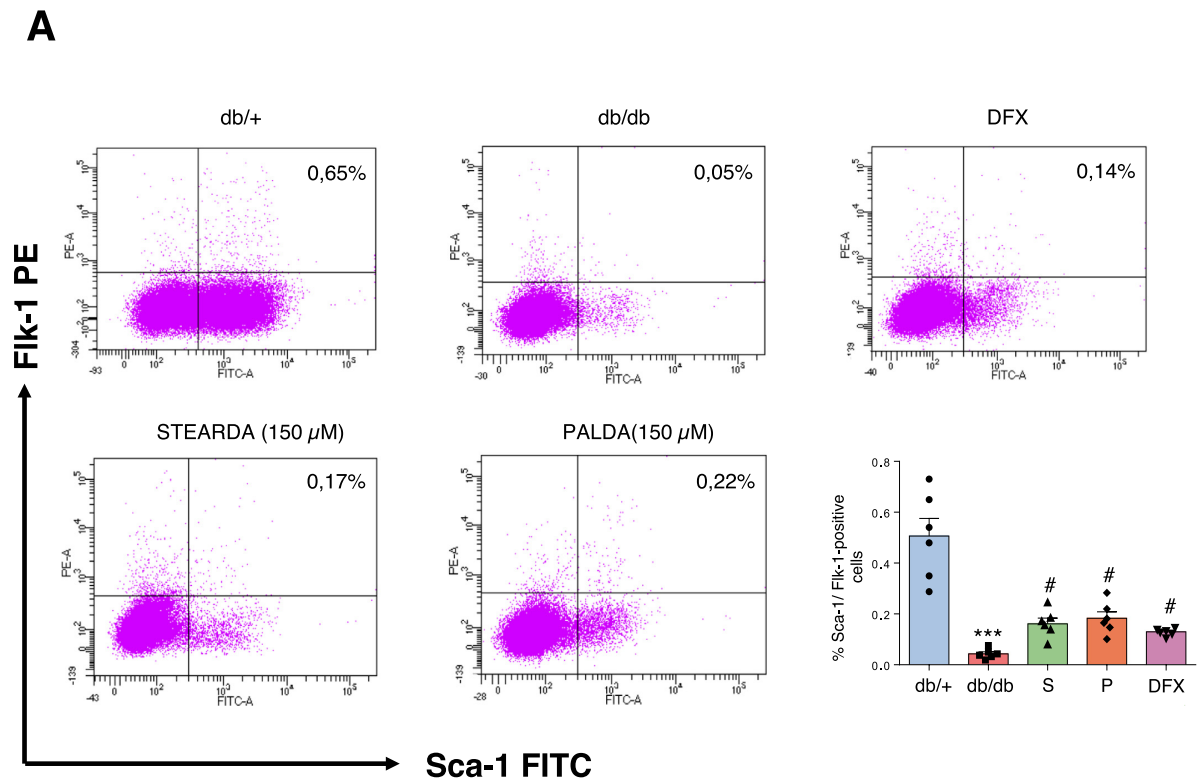


Fig. 7. STEARDA and PALDA mobilize circulating EPCs in diabetic mice. (A) Representative histograms of Sca-1/Flk-1 analysis for EPCs from control group (db/+), untreated diabetic (db/db) mice and diabetic mice (db/db) treated with DFX (1 mM), STEARDA (150 µM), PALDA (150 µM). (B) Type 2 diabetic db/db mice presented a decrease of circulating EPCs compared with normal (db/+) mice. *** $P < 0.001$ db/db control vs. db/+ control group. # $P < 0.05$ db/db treated vs. db/db control (one-way ANOVA followed Dunnett's test).

we decided to analyze the effect of the hypoximimetic activity of NADs on beta cell differentiation, insulin secretion and diabetic ulcer.

The main characteristic of diabetes is a malfunction of pancreatic beta cells which leads to an inadequate insulin secretion. In this sense, HIF-1 α factor has a key role in the innate insufficiency of beta cells to secrete insulin. First, it has been demonstrated that in both isolated pancreatic islets of diabetes type 2 patients and mice models, HIF-1 α levels are inhibited, and they play a relevant role in beta cell dysfunction [22,40]. In addition, previous reports showed that when mitochondrial metabolism is accelerated due to high glucose levels, oxygen consumption rate increases, causing less oxygen availability and beta cells can become hypoxic [42,43]. Cells responded to low oxygen levels by activating a specific gene program to improve adaptation to anaerobic metabolism and promote energy conservation. All these observations suggest that HIF-1 α induction could positively contribute to beta cell dysfunction. In a parallel way, the greatest therapeutic challenges in the treatment of diabetes are the regeneration of pancreatic beta cells from stem cell-derived pancreatic progenitors. It has been shown that pancreatic acinar cells can be successfully reprogrammed to beta cells through the introduction of a specific combination of transcription factors including Pdx1, Ngn3, NeuroD and MafA [44]. Likewise, it has been seen that these factors also induce to beta cells reprogramming in AR42J cell line stimulated with A activin and HGF and differentiated to insulin secretion cells [34]. Obviously, the effect of NADs on beta cell differentiation and insulin secretion has to be a complex process in which more factors, apart from the changes in the expression of different transcription factors such as HIF-1 α , Pdx1, etc., are involved. A more detailed investigation is necessary to clarify, for

instance, the possible participation of different cell receptors in this process. It has been previously described that OLDA stimulates in vitro insulin release from islet cell lines that endogenously express GPR119 and in vivo it enhances GIP release and improves glucose tolerance in a GPR119-dependent fashion [45]. Similarly, both OLDA and NADA are potent agonists of TRPV1 [3,46], which has also been implicated in insulin release [47]. Another relevant point to clarify in later research is whether the induction of the hypoxic response precedes or not the induction of the differentiation program in NADs action mechanism. Thus, the ability of NADs to induce the induction of HIF-1 α leading to a correct reprogramming to insulin-producing beta cells shown in our results suggests the need of a wider study of their possible application and modulation.

In this sense, NADs concentration in pathological situations remains unknown, mainly because it is difficult to analyze and because endolipids are produced on demand and quickly degraded. This is why we find it difficult to speculate about the physiological relevance of NADs on T2D and other associated pathologies, especially regarding their concentration. However, alterations of some precursors such as dopamine and long chain fatty acids have been observed in relation to T2D [48,49]. Moreover, some NADs such as NADA have been detected in the nervous system of different species and in human plasma [2–4] at nanomolar concentrations, and it has been described that NADA is short-lived and thus difficult to measure [5,9]. Furthermore, for some endocannabinoids such as AEA it has been shown that levels inside the cells at the site of inflammation can be up to µM [50]. Similarly, the levels of other endocannabinoids are high in cell lines such as insulinoma and human pancreatic islets in response to glucose

stimulation [51,52]. Glucose-stimulated pancreatic beta cells depolarize and mobilize calcium to produce insulin, thus suggesting that endocannabinoids may participate in the production of insulin regulated by pancreatic beta cells.

Moreover, in previous reports it has been suggested that both hyperglycemia and hypoxia are important factors that cause diabetic foot ulcers, since hypoxia is necessary in wound healing because it plays a fundamental role in the regulation of critical processes involved in tissue repairing [53,54]. The induction of HIF-1 α is required for the activation of angiogenic growth factors [54], recruitment of endothelial progenitor cells [55] and cell motility [56]. Other articles and our results show that hyperglycemia impairs the function and stabilization of HIF-1 α and the existence of low expression levels of HIF-1 α in diabetic foot ulcer [57]. Therefore, there is an inhibition of HIF-1 α in wound healing in diabetes [32]. We demonstrate that the inhibition of HIF-1 α for wound healing in the diabetic model db/db is reversed with the treatment with *N*-acetyl dopamines.

Among the possible use of NADs there are several options. On the one hand, and although little is known about NADs biosynthesis and catabolism, other groups have studied that fatty acid amide hydrolase (FAAH) and tyrosine hydroxylase mediate NADA biosynthesis and catechol-*O*-methyl transferase (COMT), and arylsulfotransferases (ASTs) regulates its catabolism [5,9]. Thus, it would be interesting to analyze the effect of FAAH, COMT or AST inhibitors treatment not only on NADs endogenous levels, but also on hypoxia or T2D markers. On the other hand, the levels of these endolipids could be altered through diet. NADA synthesis takes place through direct conjugation of dopamine with arachidonic acid [5], suggesting that an increase in the availability of their precursors could increase NADs endogenous levels. Lastly, and as shown in our results, we cannot rule out the possibility of a direct use on associated pathologies in both hyperglycemia and hypoxia such as diabetic foot ulcers [53,54]. We demonstrate that the inhibition of HIF-1 α for wound healing in the diabetic model db/db is reversed with the treatment with NADs.

In summary, in the present study we show how some endolipids present the ability to induce beta cell differentiation in rat pancreatic acinar cell line (AR42J) and human islet-derived precursor cells (hIPCs) through the alteration of the hypoxia response pathway. We demonstrate how NADs, in particular STEARDA and PALDA, can modulate insulin production and in parallel reverse HIF-1 α inhibition in a wound healing model in Diabetic (db/db) Mice. Therefore, the potential pharmacological modulation of NADs opens the door to the development of new therapies with important implications for diabetes prevention and treatment strategies.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.008>.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

We acknowledge Carmen Cabrero-Doncel for her assistance with the article.

Funding

This work was funded by Instituto de Salud Carlos III and Fondos FEDER (PI14/00005; co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund “investing in your future”) and MICINN

(SAF2016-75228-R) grants. MLC was supported by a FPU fellowship (FPU13/03393) from Ministerio de Educación. BP is a predoctoral fellow supported by the i-PFIS program, Instituto de Salud Carlos III (IFI15/00022; European Social Fund “investing in your future”).

Contribution statement

CJJ, MLC, BP and JAC designed, performed the experiments and analyzed data; JLM and EM contributed conceptual input; MAC conceived the study, analyzed data, wrote the manuscript and approved the final version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

References

- [1] M. Connor, C.W. Vaughan, R.J. Vandenberg, *N*-acetyl amino acids and *N*-acetyl neurotransmitter conjugates: neuromodulators and probes for new drug targets, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 1857–1871.
- [2] S.M. Huang, T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T.J. Petros, J.F. Krey, C.J. Chu, J.D. Miller, S.N. Davies, P. Geppetti, J.M. Walker, V. Di Marzo, An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 8400–8405.
- [3] C.J. Chu, S.M. Huang, L. De Petrocellis, T. Bisogno, S.A. Ewing, J.D. Miller, R.E. Zipkin, N. Daddario, G. Appendino, V. Di Marzo, J.M. Walker, *N*-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13633–13639.
- [4] D. Hauer, G. Schelling, H. Gola, P. Campolongo, J. Morath, B. Roozendaal, G. Hamuni, A. Karabatsiakis, P. Atsak, M. Vogeser, I.T. Kolassa, Plasma concentrations of endocannabinoids and related primary fatty acid amides in patients with post-traumatic stress disorder, *PLoS One* 8 (2013) e62741.
- [5] S.S. Hu, H.B. Bradshaw, V.M. Benton, J.S. Chen, S.M. Huang, A. Minassi, T. Bisogno, K. Masuda, B. Tan, R. Roskoski Jr., B.F. Cravatt, V. Di Marzo, J.M. Walker, The biosynthesis of *N*-arachidonoyl dopamine (NADA), a putative endocannabinoid and endovanilloid, via conjugation of arachidonic acid with dopamine, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 81 (2009) 291–301.
- [6] M.G. Akimov, N.M. Gretskaia, K.V. Shevchenko, V.P. Shevchenko, N.F. Miasoedov, M. Bobrov, V.V. Bezuglov, New aspects of biosynthesis and metabolism of *N*-acetyl-dopamines in rat tissues, *Bioorg. Khim.* 33 (2007) 648–652.
- [7] A. Toth, N. Kedei, Y. Wang, P.M. Blumberg, Arachidonoyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat, *Life Sci.* 73 (2003) 487–498.
- [8] T. Bisogno, D. Melck, M. Bobrov, N.M. Gretskaia, V.V. Bezuglov, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, *N*-acetyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabinimetic activity in vitro and in vivo, *Biochem. J.* 351 (Pt 3) (2000) 817–824.
- [9] A. Wojtalla, F. Herweck, M. Granzow, S. Klein, J. Trebicka, S. Huss, R. Lerner, B. Lutz, F.A. Schildberg, P.A. Knolle, T. Sauerbruch, M.V. Singer, A. Zimmer, S.V. Siegmund, The endocannabinoid *N*-arachidonoyl dopamine (NADA) selectively induces oxidative stress-mediated cell death in hepatic stellate cells but not in hepatocytes, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302 (2012) G873–G887.
- [10] C.M. Navarrete, B.L. Fiebach, A.G. de Vinuesa, S. Hess, A.C. de Oliveira, E. Candelario-Jalil, F.J. Caballero, M.A. Calzado, E. Munoz, Opposite effects of anandamide and *N*-arachidonoyl dopamine in the regulation of prostaglandin E and 8-iso-PGF formation in primary glial cells, *J. Neurochem.* 109 (2009) 452–464.
- [11] C.M. Navarrete, M. Perez, A.G. de Vinuesa, J.A. Collado, B.L. Fiebach, M.A. Calzado, E. Munoz, Endogenous *N*-acetyl-dopamines induce COX-2 expression in brain endothelial cells by stabilizing mRNA through a p38 dependent pathway, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 1805–1814.
- [12] J.M. Yoo, E.S. Park, M.R. Kim, D.E. Sok, Inhibitory effect of *N*-acetyl dopamines on IgE-mediated allergic response in RBL-2H3 cells, *Lipids* 48 (2013) 383–393.
- [13] H.T. Dang, G.J. Kang, E.S. Yoo, J. Hong, J.S. Choi, H.S. Kim, H.Y. Chung, J.H. Jung, Evaluation of endogenous fatty acid amides and their synthetic analogues as potential anti-inflammatory leads, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 1520–1527.
- [14] R. Soler-Torronteras, M. Lara-Chica, V. Garcia, M.A. Calzado, E. Munoz, Hypoximimetic activity of *N*-acetyl-dopamines. *N*-arachidonoyl-dopamine stabilizes HIF-1 α protein through a SIAH2-dependent pathway, *Biochim. Biophys. Acta* 1843 (2014) 2730–2743.
- [15] G.L. Semenza, Life with oxygen, *Science* 318 (2007) 62–64.
- [16] P. Jaakkola, D.R. Mole, Y.M. Tian, M.I. Wilson, J. Gilbert, S.J. Gaskell, A. von Kriegsheim, H.F. Hebestreit, M. Mukherji, C.J. Schofield, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation, *Science* 292 (2001) 468–472.
- [17] W.C. Hon, M.I. Wilson, K. Harlos, T.D. Claridge, C.J. Schofield, C.W. Pugh, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe, D.I. Stuart, E.Y. Jones, Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL, *Nature* 417 (2002) 975–978.
- [18] K. Nakayama, L.J. Frew, M. Hagensen, M. Skals, H. Habelhah, A. Bhoumik, T. Kadoya, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, P.B. Frappell, D.D. Bowtell, Z. Ronai, Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia, *Cell* 117 (2004) 941–952.
- [19] G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology, *Trends Mol. Med.* 7 (2001) 345–350.

- [20] L.K. Rausch, N.C. Netzer, J. Hoegel, S. Pramsohler, The linkage between breast cancer, hypoxia, and adipose tissue, *Front. Oncol.* 7 (2017) 211.
- [21] R. Cheng, J.X. Ma, Angiogenesis in diabetes and obesity, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16 (2015) 67–75.
- [22] K. Cheng, K. Ho, R. Stokes, C. Scott, S.M. Lau, W.J. Hawthorne, P.J. O'Connell, T. Loudovaris, T.W. Kay, R.N. Kulkarni, T. Okada, X.L. Wang, S.H. Yim, Y. Shah, S.T. Grey, A.V. Biankin, J.G. Kench, D.R. Laybutt, F.J. Gonzalez, C.R. Kahn, J.E. Gunton, Hypoxia-inducible factor-1 α regulates beta cell function in mouse and human islets, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 2171–2183.
- [23] Y. Sato, M. Inoue, T. Yoshizawa, K. Yamagata, Moderate hypoxia induces beta-cell dysfunction with HIF-1-independent gene expression changes, *PLoS One* 9 (2014) e114868.
- [24] D. Ochial, N. Goda, T. Hishiki, M. Kanai, N. Senoo-Matsuda, T. Soga, R.S. Johnson, Y. Yoshimura, M. Suematsu, Disruption of HIF-1 α in hepatocytes impairs glucose metabolism in diet-induced obesity mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415 (2011) 445–449.
- [25] J.J. Ban, R.J. Ruthenberg, K.W. Cho, J.W. Kim, Regulation of obesity and insulin resistance by hypoxia-inducible factors, *Hypoxia* 2 (2014) 171–183.
- [26] J. Krishnan, C. Danzer, T. Simka, J. Ukropce, K.M. Walter, S. Kumpf, P. Mirtschink, B. Ukropcova, D. Gasperikova, T. Pedrazzini, W. Krek, Dietary obesity-associated HIF1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system, *Genes Dev.* 26 (2012) 259–270.
- [27] A. Takikawa, A. Mahmood, A. Nawaz, T. Kado, K. Okabe, S. Yamamoto, A. Aminuddin, S. Sendai, K. Tsuneyama, M. Ikutani, Y. Watanabe, Y. Igarashi, Y. Nagai, K. Takatsu, K. Koizumi, J. Imura, N. Goda, M. Sasahara, M. Matsumoto, K. Saeki, T. Nakagawa, S. Fujisaka, I. Usui, K. Tobe, HIF-1 α in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance, *Diabetes* 65 (2016) 3649–3659.
- [28] A.L. Basse, M.S. Isidor, S. Winther, N.B. Skjoldborg, M. Murholm, E.S. Andersen, S.B. Pedersen, C. Wolfrum, B. Quistorff, J.B. Hansen, Regulation of glycolysis in brown adipocytes by HIF-1 α , *Sci. Rep.* 7 (2017) 4052.
- [29] B.H. Wang, P. Trayhurn, Hypoxia modulates the expression and secretion of inflammation-related adipokines in differentiated human adipocytes, *Lancet* 381 (2013) 112.
- [30] H. Thangarajah, I.N. Vial, R.H. Grogan, D. Yao, Y. Shi, M. Januszyk, R.D. Galiano, E.I. Chang, M.G. Galvez, J.P. Glotzbach, V.W. Wong, M. Brownlee, G.C. Gurtner, HIF-1 α dysfunction in diabetes, *Cell Cycle* 9 (2010) 75–79.
- [31] W. Xue, L. Cai, Y. Tan, P. Thistlethwaite, Y.J. Kang, X. Li, W. Feng, Cardiac-specific overexpression of HIF-1 α prevents deterioration of glycolytic pathway and cardiac remodeling in streptozotocin-induced diabetic mice, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 97–105.
- [32] I.R. Botusan, V.G. Sunkari, O. Savu, A.I. Catrina, J. Grunler, S. Lindberg, T. Pereira, S. Yla-Herttuala, L. Poellinger, K. Brismar, S.B. Catrina, Stabilization of HIF-1 α is critical to improve wound healing in diabetic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 19426–19431.
- [33] M. Galeano, B. Deodato, D. Altavilla, D. Cucinotta, N. Arsic, H. Marini, V. Torre, M. Giacca, F. Squadrito, Adeno-associated viral vector-mediated human vascular endothelial growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse, *Diabetologia* 46 (2003) 546–555.
- [34] H. Mashima, H. Shibata, T. Mine, I. Kojima, Formation of insulin-producing cells from pancreatic acinar AR42J cells by hepatocyte growth factor, *Endocrinology* 137 (1996) 3969–3976.
- [35] N.R. Prabhakar, G.L. Semenza, Oxygen sensing and homeostasis, *Physiology* 30 (2015) 340–348.
- [36] L. Zheng, C.J. Kelly, S.P. Colgan, Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the theme: cellular responses to hypoxia, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 309 (2015) C350–C360.
- [37] C.M. Taniguchi, E.C. Finger, A.J. Krieg, C. Wu, A.N. Diep, E.L. LaGory, K. Wei, L.M. McGinnis, J. Yuan, C.J. Kuo, A.J. Giaccia, Cross-talk between hypoxia and insulin signaling through Phd3 regulates hepatic glucose and lipid metabolism and ameliorates diabetes, *Nat. Med.* 19 (2013) 1325–1330.
- [38] S.K. Ramakrishnan, H. Zhang, S. Takahashi, B. Centofanti, S. Periyasamy, K. Weisz, Z. Chen, M.D. Uhler, L. Rui, F.J. Gonzalez, Y.M. Shah, HIF2 α is an essential molecular brake for postprandial hepatic glucagon response independent of insulin signaling, *Cell Metab.* 23 (2016) 505–516.
- [39] K. Alexiadou, J. Doupis, Management of diabetic foot ulcers, *Diab. Ther.* 3 (2012) 4.
- [40] J.E. Gunton, R.N. Kulkarni, S. Yim, T. Okada, W.J. Hawthorne, Y.H. Tseng, R.S. Robertson, C. Ricordi, P.J. O'Connell, F.J. Gonzalez, C.R. Kahn, Loss of ARNT/HIF1 β mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes, *Cell* 122 (2005) 337–349.
- [41] N. Zhang, Z. Fu, S. Linke, J. Chicher, J.J. Gorman, D. Visk, G.G. Haddad, L. Poellinger, D.J. Peet, F. Powell, R.S. Johnson, The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1 α is an essential regulator of metabolism, *Cell Metab.* 11 (2010) 364–378.
- [42] Y. Sato, H. Endo, H. Okuyama, T. Takeda, H. Iwahashi, A. Imagawa, K. Yamagata, I. Shimomura, M. Inoue, Cellular hypoxia of pancreatic beta-cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 12524–12532.
- [43] M. Bensellam, B. Duvillie, G. Rybachuk, D.R. Laybutt, C. Magnan, Y. Guiot, J. Pouyssegur, J.C. Jonas, Glucose-induced O(2) consumption activates hypoxia inducible factors 1 and 2 in rat insulin-secreting pancreatic beta-cells, *PLoS One* 7 (2012) e29807.
- [44] Q. Zhou, J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal, D.A. Melton, In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells, *Nature* 455 (2008) 627–632.
- [45] Z.L. Chu, C. Carroll, R. Chen, J. Alfonso, V. Gutierrez, H. He, A. Lucman, C. Xing, K. Sebring, J. Zhou, B. Wagner, D. Unett, R.M. Jones, D.P. Behan, J. Leonard, N-oleoyldopamine enhances glucose homeostasis through the activation of GPR119, *Mol. Endocrinol.* 24 (2010) 161–170.
- [46] L. De Petrocellis, C.J. Chu, A.S. Moriello, J.C. Kellner, J.M. Walker, V. Di Marzo, Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels, *Br. J. Pharmacol.* 143 (2004) 251–256.
- [47] Y. Akiba, S. Kato, K. Katsube, M. Nakamura, K. Takeuchi, H. Ishii, T. Hibi, Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321 (2004) 219–225.
- [48] R.N. Lemaitre, A.M. Fretts, C.M. Sitali, M.L. Biggs, K. Mukamal, I.B. King, X. Song, L. Djousse, D.S. Siscovick, B. McKnight, N. Sotoodehnia, J.R. Kizer, D. Mozaffarian, Plasma phospholipid very-long-chain saturated fatty acids and incident diabetes in older adults: the Cardiovascular Health Study, *Am. J. Clin. Nutr.* 101 (2015) 1047–1054.
- [49] A. Kleindridders, W. Cai, L. Cappellucci, A. Ghazarian, W.R. Collins, S.G. Vinnerberg, E.N. Pothos, C.R. Kahn, Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 3463–3468.
- [50] K.K. Biswas, K.P. Sarker, K. Abeyama, K. Kawahara, S. Iino, Y. Otsubo, K. Saigo, H. Izumi, T. Hashiguchi, M. Yamakuchi, K. Yamaji, R. Endo, K. Suzuki, H. Imaizumi, I. Maruyama, Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis, *Hepatology* 38 (2003) 1167–1177.
- [51] F.J. Bermudez-Silva, J. Suarez, E. Baixerias, N. Cobo, D. Bautista, A.L. Cuesta-Munoz, E. Fuentes, P. Juan-Pico, M.J. Castro, G. Milman, R. Mechoulam, A. Nadal, F. Rodriguez de Fonseca, Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas, *Diabetologia* 51 (2008) 476–487.
- [52] I. Matias, M.P. Gonthier, P. Orlando, V. Martiadis, L. De Petrocellis, C. Cervino, S. Petrosino, L. Hoareau, F. Festy, R. Pasquali, R. Roche, M. Maj, U. Pagotto, P. Monteleone, V. Di Marzo, Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 3171–3180.
- [53] A.A. Tandara, T.A. Mustoe, Oxygen in wound healing—more than a nutrient, *World J. Surg.* 28 (2004) 294–300.
- [54] B.D. Kelly, S.F. Hackett, K. Hirota, Y. Oshima, Z. Cai, S. Berg-Dixon, A. Rowan, Z. Yan, P.A. Campochiaro, G.L. Semenza, Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1, *Circ. Res.* 93 (2003) 1074–1081.
- [55] D.J. Ceradini, A.R. Kulkarni, M.J. Callaghan, O.M. Tepper, N. Bastidas, M.E. Kleinman, J.M. Capla, R.D. Galiano, J.P. Levine, G.C. Gurtner, Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1, *Nat. Med.* 10 (2004) 858–864.
- [56] W. Li, Y. Li, S. Guan, J. Fan, C.F. Cheng, A.M. Bright, C. Chinn, M. Chen, D.T. Woodley, Extracellular heat shock protein-90 α : linking hypoxia to skin cell motility and wound healing, *EMBO J.* 26 (2007) 1221–1233.
- [57] S.B. Catrina, K. Okamoto, T. Pereira, K. Brismar, L. Poellinger, Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 α protein stability and function, *Diabetes* 53 (2004) 3226–3232.

DR. MARCO A. CALZADO (Orcid ID : 0000-0002-5338-535X)

Received Date : 04-Jul-2018

Revised Date : 24-Jul-2018

Accepted Date : 03-Aug-2018

Article type : Research Article

Metabolomic profiling of human lung tumor tissues: nucleotide metabolism as a candidate for therapeutic interventions and biomarkers

Paula Moreno^{1,3*}, Carla Jiménez-Jiménez^{1,2*}, Martín Garrido-Rodríguez⁵, Mónica Calderón-Santiago^{1,4}, Susana Molina^{1,2}, Maribel Lara-Chica^{1,2}, Feliciano Priego-Capote^{1,4}, Ángel Salvatierra^{1,3}, Eduardo Muñoz^{1,2} and Marco A. Calzado^{1,2}

¹ Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain.

² Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain.

³ Unidad de Cirugía Torácica y Trasplante Pulmonar. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain.

⁴ Departamento de Química Analítica, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain.

⁵ Innohealth Group, Madrid, Spain.

*These authors contributed equally to this study.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/1878-0261.12369

Molecular Oncology (2018) © 2018 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Corresponding Author: Marco A. Calzado Ph.D.

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)

Avda. Menendez Pidal s/n. 14004, Córdoba, Spain

Phone: + 34 957213762

e-mail: mcalzado@uco.es

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest

Running title: Metabolomic profiling of human lung cancer

Abbreviations

LC	Lung cancer
NSCLC	Non-small cell lung cancer
LCC	Large-cell carcinoma
AC	Adenocarcinoma
SCC	Squamous cell lung carcinoma
UPLC/MS/MS	Ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry
GC/MS	Gas chromatography–mass spectrometry
ATIC	IMP cyclohydrolase
ADSL	Adenylsuccinate lyase

ABSTRACT

Although metabolomics has enjoyed considerable attention in the field of lung cancer detection and management, only a very limited number of works have applied it to tissues. As such, the aim of this study was the thorough analysis of metabolic profiles of relevant lung cancer tissues, including the most important histological subtypes (adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma). Mass spectrometry-based metabolomics, along with gene expression and histological analyses, were performed as part of the widest study to date to identify metabolic alterations in tumors of the most relevant histological subtypes in lung. A total of 136 lung tissue samples were analyzed, and 851 metabolites were identified through metabolomic analysis. Our data show the existence of a clear metabolic alteration not only between tumor vs. nonmalignant tissue in each patient, but also inherently intrinsic changes in both

adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma. Significant changes were observed in the most relevant biochemical pathways, and nucleotide metabolism showed an important number of metabolites with high predictive capability values. The present study provides a detailed analysis of the metabolomic changes taking place in relevant biochemical pathways of the most important histological subtypes of lung cancer, which can be used as biomarkers and also to identify novel targets.

Keywords: Metabolomics, Lung cancer, Biomarkers, Nucleotides.

1. INTRODUCTION

Lung cancer (LC) is nowadays the leading cause of death from cancer in the world. The most common type of lung cancer is non-small cell lung cancer (NSCLC), which represents 85% of all lung cancers. The most important histological subtypes include adenocarcinoma (AC), squamous cell lung carcinoma (SCC) and large-cell carcinoma (LCC), from which AC and SCC represent approximately 90% of all cases (Falco et al., 2016). Generally, diagnosis takes place after the first symptoms have already appeared, which normally happens at an advanced stage. Although different methods such as computerized tomography scans and bronchoscopy have contributed to detection of the disease, they do not increase likelihood of early diagnosis (National Lung Screening Trial Research et al., 2011).

In the search for new cancer markers to be applied with a minimally invasive screening methodology, the field of metabolomics has enjoyed a considerable interest in the last years (Aboud and Weiss, 2013). Samples that can be analyzed in metabolomics include cells, fluids or tissues, being biofluids such as urine, total blood, plasma, serum and saliva the most widely used because of their minimally invasive method to be obtained. Although there is an increasing interest in studies using tumor tissues, few analyses have been carried out, mainly due to the difficulty of obtaining this type of samples (Armitage and Southam, 2016).

The analysis of the metabolomics profile characterizing LC is still in its early stages. Nevertheless, different approximations have been developed to identify altered metabolites in LC through monitoring several types of samples such as serum (Kumar et al., 2017), plasma (Louis et al., 2017), urine (Haznadar et al., 2016), sputum

Accepted Article

(O'Shea et al., 2016) or sweat (Calderon-Santiago et al., 2015). On the contrary, to date only a very limited number of works have directly analyzed metabolic differences in tissues. The first approach was performed by Fan TWM et al., who analyzed ¹³C-glucose labeled tissue extracts from 12 patients to show an alteration in the Krebs cycle activity and the pyruvate carboxylation (Fan et al., 2009). Later, Rocha et al. analyzed the differences between tumor and non-involved adjacent lung tissues of 12 samples and proved a clear increase in phosphocholine, lactate and glycerophosphocholine (GPC) levels in tumors, while inosine/adenosine, acetate, myo-inositol and glucose decreased (Rocha et al., 2010). That same year, Jordan KW et al. described the analysis of tissue samples from 14 subjects with AC (9 subjects) and SCC (5 subjects) compared to control samples (7 subjects) (Jordan et al., 2010). In 2011, Hori S et al. performed a metabolomic analysis of LC from 7 patients, finding significant changes in 40 metabolites (Hori et al., 2011). Kami et al. reported a metabolomic profiling of 9 samples of lung tumor tissues, proving a high glycolytic activity in them (Kami et al., 2013). Finally, Miyamoto S group has recently described different metabolic perturbations associated with AC (Fahrman et al., 2017; Wikoff et al., 2015), and Rocha et al. have analyzed through ¹H NMR metabolomics matched tumors and adjacent control tissues from 56 subjects with different types of primary lung carcinomas (Rocha et al., 2015).

Although the use of monitoring metabolic levels as a tool to detect the early stages in some oncological diseases can be applied to easy-to-obtain samples, such as serum or plasma, knowing the changes originally suffered by the tissue is especially important in the search of these markers. This is why the aim of this study has been the thorough analysis of the metabolic profile of a relevant number of lung cancer tissues belonging to the most prevalent histological subtypes (AC and SCC) and their corresponding adjacent healthy tissue from the same patient. As far as we are aware, this study is to date the widest in number of samples and histological subtypes analyzed. The obtained data prove the presence of biochemical changes at tissue level in the different LC samples, which can be useful to identify biomarkers and to increase the knowledge of the metabolic reprogramming developed during tumorigenesis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Patient cohorts

Lung tissue samples from patients treated surgically for primary lung cancer were obtained at University Hospital Reina Sofia (Cordoba, Spain). This research study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the Cordoba Clinical Research Ethics Committee. Tissue samples were stored and managed by the Cordoba node belonging to the Biobank of the Andalusian Health Service (Servicio Andaluz de Salud-SAS). All patients signed a written informed consent document indicating their voluntary donation. All samples were histologically reviewed and classified, frozen and stored at -80 °C until analysis, and the remaining specimen was formalin-fixed and paraffin-embedded for conventional diagnostic studies and immunohistochemical analysis. None of the patients received chemotherapy or radiation therapy before the operation, and clinicopathological data were prospectively collected.

2.2. Metabolomic Analysis

2.2.1. Sample Preparation

Metabolomic profiling analysis was performed by Metabolon as previously described (Reitman et al., 2011). Samples were prepared using the automated MicroLab STAR® system from Hamilton Company. A recovery standard was added prior to the first step in the extraction process for quality control purposes. Sample preparation was conducted using aqueous methanol extraction process to remove the protein fraction while allowing maximum recovery of small molecules. The resulting extract was divided into four fractions: one for analysis by UPLC/MS/MS (positive mode), one for UPLC/MS/MS (negative mode), one for GC/MS, and one for backup. Samples were placed briefly on a TurboVap® (Zymark) to remove the organic solvent. Each sample was then frozen and dried under vacuum. Samples were then prepared for the appropriate instrument, either UPLC/MS/MS or GC/MS.

2.2.2. Ultrahigh performance liquid chromatography/Mass Spectroscopy (UPLC/MS/MS)

The LC/MS portion of the platform was based on a Waters ACQUITY ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and a Thermo-Finnigan linear trap quadrupole (LTQ) mass spectrometer, which consisted of an electrospray ionization (ESI) source and a linear ion-trap (LIT) mass analyzer (Evans et al., 2009). The sample extract was dried, and then reconstituted in acidic or basic LC-compatible solvents,

each of which containing 11 or more injection standards at fixed concentrations to ensure injection and chromatographic consistency. One aliquot was analyzed using acidic positive ion optimized conditions and the other using basic negative ion optimized conditions in two independent injections using separate dedicated columns. Extracts reconstituted in acidic conditions were gradient eluted using water and methanol containing 0.1% formic acid, while the basic extracts, which also used water/methanol, contained 6.5 mM Ammonium Bicarbonate. The MS analysis alternated between MS and data-dependent MS² scans using dynamic exclusion. Raw data files are archived and extracted as described below.

2.2.3. Gas chromatography/Mass Spectroscopy (GC/MS)

The samples destined for GC/MS analysis were re-dried under vacuum desiccation for a minimum of 24 hours prior to being derivatized under dried nitrogen using bistrimethyl-silyl-trifluoroacetamide (BSTFA). The GC column was 5% phenyl and the temperature ramp was from 40° to 300 °C in a 16-minute period. Samples were analyzed on a Thermo-Finnigan Trace DSQ fast-scanning single-quadrupole mass spectrometer using electron impact ionization. The instrument was tuned and calibrated for mass resolution and mass accuracy on a daily basis. The information output from the raw data files was automatically extracted as discussed below.

2.2.4. Quality assurance/QC

For QA/QC purposes, additional samples were included with each day's analysis. These samples included extracts of a pool of well-characterized human plasma, extracts of a pool created from a small aliquot of the experimental samples and process blanks. QC samples were spaced evenly among the injections and all experimental samples were randomly distributed throughout the run. A selection of QC compounds was added to every sample for chromatographic alignment, including those under test. These compounds were carefully chosen so as not to interfere with the measurement of the endogenous compounds.

2.2.5. Data extraction and compound identification

Raw data was extracted, peak-identified and QC processed. Compounds were identified by comparison to library entries of purified standards or recurrent unknown entities. Biochemical identifications are based on three criteria: retention index within a narrow RI window of the proposed identification, nominal mass match to the library +/- 0.2 amu and the MS/MS forward and reverse scores between the experimental data

Accepted Article

and authentic standards. The MS/MS scores are based on a comparison of the ions present in the experimental spectrum to the ions present in the library spectrum. While there may be similarities between these molecules based on one of these factors, the use of all three data points can be utilized to distinguish and differentiate biochemicals. Based on the literature and on KEGG/HMDB databases, metabolites were annotated to one of 8 “super-pathways” corresponding to its general metabolic processes (Amino acid, Lipid, Carbohydrate, Nucleotide, Peptide, Energy, Cofactors and vitamins and Xenobiotics), and to one of 73 “sub-pathways” representing more specific metabolic pathways or biochemical subclasses. The three networks (metabolite, sub-pathway and super-pathway) together depict the hierarchical map and have been used in previous studies (Krusmiek et al., 2012; Poisson et al., 2015)(Dataset Supplementary Table 1).

2.2.6. Data Analysis and Statistics

A final .csv containing information about the area of metabolites in all samples was imported in R (URL <http://www.R-project.org>) through the interface of Rstudio (URL <https://www.rstudio.com>) for further statistical analysis and graphics plot. Missing values (if any) are assumed to be below the level of detection. However, metabolites detected in all samples from one or more groups but not in samples from other groups were assumed to be near the lower limit of detection in the groups in which they were not detected. In this case, the lowest detected level of these metabolites was imputed for samples in which that metabolite was not detected. Pathways were assigned for each metabolite, allowing examination of overrepresented pathways. After imputation with minimum observed values, the datasets were log transformed for further analyses. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used as unsupervised and supervised multivariate approaches to visualize metabolic changes occurring in tumor tissues as compared to normal tissue. The PLS-DA was applied with a 10-fold internal validation. A paired two-sample *t*-test was used to identify metabolites that differed significantly between the tumor and normal tissue. On the other hand, a Welch Two Sample T-Test was applied on the log transformed tumor/normal tissue ratios to compare metabolite levels across different tumor types. The same analysis was applied at super-pathway level. The R packages employed for statistical analysis and plot generation were pheatmap 1.0.8, ggplot2 2.2.1, mixOmics 6.3.1 and MetaboAnalystR 0.0.0.9.

2.3. Histologic analysis

Immunohistochemical staining was performed on formalin-fixed, paraffin embedded samples. Five-micrometer sections were deparaffinised in xylene and rehydrated in a graded ethanol series. Staining with the rabbit polyclonal anti-ATIC antibody (HPA021012, Sigma-Aldrich) at 1:200 dilution or anti-ADSL antibody (HPA000525, Sigma-Aldrich) at 1:100 dilution was performed overnight at 4 °C. Staining was evaluated as follows: 0, no staining or faint staining in less than 10% of the cells; 1, 10-25% of stained cells; 2, 26-50% of stained cells; 3, 51-75% of stained cells; 4, more than 74% of stained cells.

2.4. mRNA extraction and qPCR

Total RNA was isolated from tissues stored in RNAlater® using the RNeasy Plus Universal Mini Kit, the TissueLyser LT and a Qiacube (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Total RNA concentration and integrity (RIN>9) were analyzed using Experion® automated electrophoresis station (Bio-Rad, CA, USA). Isolated RNA was converted to cDNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Real-time PCR was employed with GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) in an iCYCLER detection system (Bio-Rad). The amplification profile consisted of an initial denaturation for 5 min at 95 °C and then 39 cycles of 30 s at 95 °C, annealing for 10 s at a temperature of 60 °C (*GMPR*, *GMPS*, *IMPDH2*, *XDH*, *ADA* genes); 57,3 °C (*ADSL*, *ADSS*, *ATIC* genes); 63 °C (*HPRT* gene) or 62,2 °C (*ITPA* gene), 30 seconds at 72 °C for extension and one denaturation step of 1 minute at 97 °C. Amplification efficiencies were validated and normalized against β actin, and fold change in gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The following primers were used: *ADA*, forward, 5'-CCATTCTGCACACACGTATACC-3', reverse, 5'-TGGCCAGGGCACATAATCA-3'; *IMPDH2*, forward, 5'-AGGGAAAGTTGCCCATTGTAAA-3', reverse, 5'-TGGGTAGTCCCGATTCTTCTTC-3'; *GMPS*, forward, 5'-ATGGCTCTGTGCAACGGAG-3', 5'-CCTCACTCTTCGGTCTATGACT-3'; *GMPR*, forward, 5'-AATGTAGCCGTGAGTTCAGGC-3', 5'-GCCATAATGGTGTGTTTCAGGAAA-3'; *XDH*, forward, 5'-ACCGCTTCCACTACTTCAGCTAT-3', 5'-TTAGACTGGAGCCAACATCCATG-3'; *ATIC*, forward, 5'-TCTGATGCCTTCTTCCCTTT-3', 5'-AGGTTTCGTATGAGCGAGGAT-3'; *HPRT1*, forward, 5'-AATTATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT-3', 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC-3'; *ITPA*, forward, 5'-AGCTGGCTCTGCTCTGAGAAA-3', 5'-GCTGTAGGAGAGAGCAGTGAATCC-3';

ADSL, forward, 5'-TGGTGACAGAAAAGGCAGGA-3', 5'-GCGTATGTCGGTGCAAATCT-3'; *ADSS*, forward, 5'-AGGGGTAGAGAGTTTGGTGT-3', 5'-GTGCCAACGCAGTAAATCCA-3'.

2.5 Analysis of public data from cancer genomics studies

To analyze *ADSL* and *ATIC* genetic alterations including mRNA expression z-scores (Microarray, threshold 2.0), data from The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA)(Lung Adenocarcinoma and Lung Squamous Cell Carcinoma Provisional sequenced tumors sample sets) were analyzed using cBioportal software (<http://www.cbioportal.org/>) and visualized using the standard Oncoprint output showing altered columns. Effect of *ADSL* and *ATIC* gene expression on lung cancer patients' prognostic was evaluated by Kaplan-Meier survival curves of lung cancer patients with low or high expression of *ADSL* and *ATIC* with data from Kaplan-Meier Plotter (www.kmplot.com/analysis). Data were collected using all available patients restricted to histological subtype for 120 months. Kaplan-Meier plots were constructed using GraphPad Prism version 6.0c, and a long-rank test was calculated to determine differences among overall survival according to *ADSL* and *ATIC* mRNA levels by SPSS 11.5.0 for Windows.

3. RESULTS

3.1. Metabolomic profile of lung tissues

A total of 136 lung tissue samples were selected, which were histologically reviewed and classified as AC (n=33) or SCC (n=35), together with their corresponding samples of adjacent normal lung tissue from the same patient. All the samples were obtained, classified and stored by pathologists following biobank quality assurance steps. The clinicopathological characteristics of the entire patient cohort are summarized in Table 1. A total of 851 metabolites were identified through metabolomic analysis in both histological subtypes, which gave a comprehensive snapshot of the metabolic state of lung tissues. Unsupervised analysis by PCA applied to the complete dataset revealed a clear discrimination pattern for both histological subtypes, AC and SCC, versus normal lung tissue as shown in Supplementary Figure 1. This discrimination was supported on critical metabolic changes occurring in lung tissues. In fact, we identified a total of 280 compounds in AC and 623 in SCC with significant concentration differences between the experimental groups, with a total of 237 metabolites common for both (Supplementary Data 1).

Accepted Article

According to these results, we analyzed the different metabolic profiles obtained from normal and tumor tissues through visualization in heat maps, where data was normalized and prioritized in different metabolic pathways, as well as ordered according to the differential expressions between tumor and healthy tissues. As shown in figure 1A, the obtained results divide the tumor and normal tissue samples into two clearly different groups in nearly all cases. Although there are differences between AC and SCC in the hierarchy of metabolic pathways, the most altered in tumor tissue are those related to peptides, nucleotides, amino acids and lipids. Next, we examined the expression changes found between the same patient samples (tumor vs. healthy) in the list of common metabolites of both pathologies. As shown in figure 1B, although major differences are not detected, there is an increase in the induction levels of metabolites related to peptides and amino acids in the case of SCC. Altogether, these data show the existence of a clear metabolic alteration not only between tumor vs. healthy tissue in each patient, but also inherently intrinsic to both pathologies.

3.2. Metabolism of glucose in lung cancer

Next, we performed a detailed analysis of relevant metabolites showing significant changes hierarchically in the most important pathways. As shown in figure 2, we detected a significant decrease in the levels of various glycolysis metabolites involved in both tumor subtypes, such as glucose, 3- and 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate. These were also accompanied by a significant accumulation of lactate and pyruvate (at least in SCC), final products of glycolysis. A significant increase in the pentose phosphate pathway was also evident, including ribose, ribose 5-phosphate, sorbitol and fructose. In regards to the tricarboxylic acid pathway metabolites, we observed an increase in several intermediate metabolites, such as fumarate and malate in both tumor subtypes, and oxalacetate in SCC. In the same sense, we found other changes suggesting an increase in the use of glucose, for example, a significant increase in the levels of sugar alcohols and amino sugars.

3.3. Glutathione levels, oxidative stress markers and polyamine metabolism

Glutathione plays a determining role in antioxidant defense, redox homeostasis and toxin detoxification (Jozefczak et al., 2012). The obtained results show an increase in methionine sulfoxide (MetO) levels in both tumor subtypes compared to healthy tissue, along with reduced glutathione. Similarly, we observed an increase in cystathionine,

cysteine and glycine, which are limiting components of glutathione synthesis (Fig. 3A). On the contrary, there are differences between AC and SCC in the changes of both oxidized glutathione levels and cysteine-glycine levels. Changes detected in gamma-glutamyl amino acid levels suggest an alteration in the levels of glutathione. Equally, tumor samples showed high levels of antioxidants, such as ascorbate and α -tocopherol. Altogether, these findings show an accumulation of oxidative stress markers and antioxidants.

Arginine metabolism has an important role in the remodeling of the extracellular matrix and the production of polyamines, creatine and nitric oxide (Rath et al., 2014). As shown in figure 3B, we observed a light increase in arginine, ornithine and citrulline levels, as well as in aspartate in the tumor tissue compared to the healthy tissue. On the contrary, tumor tissues showed significant high levels of polyamines such as putrescine, spermine and spermidine, as well as numerous molecules related to polyamines, such as N-Acetylputrescine and 5-methylthioadenosine (MTA). As regards the remodeling markers of the extracellular matrix, we found a significant increase in proline, trans-4-hydroxyproline and pro-hydroxy-pro, as well as in asymmetric dimethylarginine (ADMA).

3.4. Fatty acids, lipid mediators and One Carbon metabolism

Fatty acids are a valuable energy source for mitochondrial oxidation and ATP cell generation (Lehner and Quiroga, 2016). The metabolomic profile of tumor tissues showed a significant increase in monoacylglycerols and glycerol, as well as elevated levels of medium- and long-chain fatty acids (Fig. 4A). Additionally, multiple phospholipid metabolites, including choline phosphate, phosphoethanolamine, cytidine 5'-diphosphocholine, glycerophosphorylcholine (GPC) and glycerol 3-phosphate (G3P), were also significantly elevated. We observed a significant increase in the levels of essential fatty acids such as dihomo-linolenate and arachidonate. In contrast, citrate, carnitine and carnitine conjugated lipids were significantly lower. Thus, these observations suggest lipid oxidation may be disrupted in lung tumor tissue.

There are previous studies which have associated carbon metabolism with carcinogenesis mainly due to its role in DNA synthesis (Newman and Maddocks, 2017). As shown in figure 4B, we detected a significant increase in the levels of glycine, sarcosine, S-adenosylhomocysteine (SAH), methionine and homocysteine. By contrast, a decrease in the levels of betaine and ornithine was observed. These

changes were also accompanied by an increase in the levels of 5-methyltetrahydrofolate (THF), as well as in the number of metabolites related to riboflavin metabolism in both tumor subtypes.

3.5. Nucleotide catabolism

As explained above in figure 2, we observed a significant increase in ribose-5-phosphate levels in tumor tissue, the initial substrate in purine pathway. A detailed analysis of this pathway also shows a significant increase in its first products, such as AMP (Adenosine 5-Monophosphate) or IMP (Inosine 5-Monophosphate)(Fig. 5A). In addition, we detected a significant accumulation of multiple products from purine catabolism such as inosine, hypoxanthine, xanthine and xanthosine, as well as adenosine, adenine and guanosine. In contrast, it should be noted that we found significant changes in the expression of xanthosine 5'-monophosphate (XMP) only in SCC, as well as a decrease in guanine levels. We also detected light changes in urate expression, especially in AC, as a result of the degradation of purine metabolism. Similarly, alterations in the pyrimidine pathway were detected. Significant high levels of cytidine-3' and 5'-monophosphate (CMP) were detected in tumor tissue, as well as pyrimidine metabolites such as uridine and cytidine, which were accompanied by significantly elevated levels of the catabolites uracil, dihydrouracil, and beta-alanine.

3.6. Analysis of the genic expression profile in purine metabolism.

Histological expression of ATIC and ADSL

As we show above in Figure 1A, the most altered metabolic pathways in both histological subtypes were those related to peptides and nucleotides. This statistical difference between metabolite levels in tumor and normal tissues, together with the clear relevance of the nucleotide metabolism in the development of tumorigenesis, led us to analyze this pathway in more detail. Thus, the first evaluation consisted in an unsupervised analysis by PCA to look for discrimination patterns using metabolites included in the nucleotide metabolic pathway for AC and SCC versus normal tissue (Supplementary Figure 2). The clearest discrimination in the metabolism of nucleotides was the one found between SCC and normal tissues. Nevertheless, discrimination trends were also observed between AC and normal tissues and between AC and SCC tissues.

The same scenario was found by PLS-DA as seen in Figure 5B, which shows a clear discrimination effect both in AC and SCC versus normal tissue when considering altered metabolites. As can be seen, the percentage of variability explained was above 50% in both cases, which is representative. An additional analysis considering only those metabolites commonly altered in AC and SCC was performed to study the existence of discrimination patterns, showing the existence of differences in the levels of metabolites. Accuracy, R^2 and Q^2 parameters for the three PLS-DA models, detailed in Supplementary Figure 3, provide an overview about their discrimination performance.

Further Random Forest analysis provided the top-10 metabolites with the highest discrimination power for AC and SCC tissues versus the corresponding normal tissues (Fig. 5C). 5,6-dihydrouracil and inosine were the two metabolites with the highest discrimination capability for AC, while 2'-O-methylguanosine and 5-methyluridine were for SCC cases. We analyzed the predictive capability of the top-5 metabolites for diagnostic purposes. Figure 6 shows the box plots and ROC curves obtained for each compound for AC and SCC cases.

Finally, we decided to study, in both histological subtypes, the most relevant enzymes involved in the regulation of purine catabolism, selecting the top-10 according to their role in the pathway (Supplementary Figure 4). As shown in Figure 7A, we found significant changes in the genic expression of 6 enzymes, 4 of which presenting different expression patterns in both histological subtypes. Due to the importance of purinosome as a possible new therapeutic target in the treatment of lung cancer (Jackson et al., 2013), we decided to closely look into the analysis of *ATIC* (*IMP cyclohydrolase*) and *ADSL* (*adenylsuccinate lyase*). First, analyses of available data from The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA, n=230 for AC and n=179 for SCC) revealed that 7% of the human SCC cases and 9% of the AC cases present genetic alterations in *ATIC*, which are associated with deep deletion and mRNA down-regulation in SCC and amplification and mRNA up-regulation in AC. Similarly, in the case of *ADSL*, 18% of the human SCC cases and 8% of the AC cases present genetic alterations, generally mRNA up-regulation (Fig. 7B). These results are similar to those obtained with our series of data. The analysis of *ATIC* and *ADSL* protein expression through immunohistochemistry (Fig. 7C-D) showed much more intense in tumor as compared to healthy tissue for AC and SCC cases. Finally, we analyzed either *ATIC* or *ADSL* expression with the information of general and relapse-free survival in both histological subtypes available from TCGA and several GEO studies (n=724 for AC

Molecular Oncology (2018) © 2018 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd

and n= 524 for SCC). As shown in Figure 8, in all cases there is a clear significant relation between survival and *ATIC* or *ADSL* expression. Interestingly, in the case of *ADSL* expression the association to survival is opposed depending on the histological subtypes analyzed.

4. DISCUSSION

To date this study represents, to our knowledge, the widest research performed in lung tissue to find the metabolic differences between tumors of the most important histological subtypes and normal tissue from the same patient. We have mainly selected tumors at an early stage, so that we could have the track of the initial biochemical perturbations taking place in the process of tumorigenesis.

A detailed analysis of the glucose metabolism showed changes consistent with a Warburg effect, a signature of cancer metabolism where rapidly dividing cells display an elevated glucose uptake and an activated glycolysis with an increased activity of the pentose phosphate pathway as required for the production of nucleotides (Fig. 2) (Jiang et al., 2014). Further support of this includes the accumulation of TCA cycle intermediates, together with a significant elevation of pentose sugar alcohols and amino sugars. Furthermore, higher levels of sorbitol can also contribute to the generation of glycation products as reported in the lung cancer literature (Ahmad et al., 2017), and which were also detected in the present study. Higher lactate levels may result from the rapid shuttling of these glycolytic metabolites to support energy generation. Together, these findings suggest alterations in glucose uptake and utilization, which may support an increase in pentose phosphate pathway activity and the generation of glycation products that potentially contribute to the pathogenesis and growth of these tumors.

Related to the glutathione levels and additional markers of oxidative stress, the increase observed in MetO, reduced glutathione, cysteine and glycine levels in both tumor subtypes provides further support for changes associated with an increase in oxidative stress (Fig. 3A). In this sense, cysteine has been shown to be elevated in various types of cancer including lung cancer (Gamcsik et al., 2012; Krepla et al., 1997), and the glycine decarboxylase, the enzyme responsible for glycine degradation, has been related with tumor-initiating cells in lung NSCC cancer (Berezowska et al., 2017; Lin et al., 2017). Interestingly, there were also consistently elevated levels of gamma-glutamyl amino acids, which are generated by gamma-glutamyl transpeptidase

Molecular Oncology (2018) © 2018 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd

(GGT). Altered GGT levels are a clear marker of oxidative stress and are often significantly increased in human malignancy (Corti et al., 2010). Finally, the high levels of powerful antioxidants detected, such as ascorbate and α -tocopherol, support the idea that in lung tumors an accumulation of oxidative stress markers and antioxidants takes place.

Regarding arginine metabolism, we observed a light difference in arginine ornithine and citrulline, as well as in aspartate levels (Fig. 3B). Initially, these results were unexpected, since previous studies reported an increase of these metabolites in some types of cancer (Wheatley and Campbell, 2002), and ornithine decarboxylase (ODC), the enzyme responsible for putrescine biogenesis, is significantly elevated in multiple lung cancers (Grimminger et al., 2010; Tian et al., 2006). However, a metabolomic previous study in AC shows similar results, which suggests the need of a detailed study of this aspect (Wikoff et al., 2015). On the contrary, higher levels in tumor tissues of other polyamines (putrescine, spermine and spermidine), as well as molecules related (N-Acetylputrescine and MTA), critical regulators of nucleic acid stabilization and cell cycle progression, were detected (Gerner and Meyskens, 2004; Pegg, 2009). Altogether, these results, along with the higher levels detected of proline, pro-hydroxypro or ADMA in the tumor samples, suggest an increase in extracellular matrix remodeling, cellular proliferation and lung function (Rafikova et al., 2016; Wells et al., 2009).

These alterations are consistent with the changes observed in the metabolism of fatty acids and lipid mediators. Cancerous lung tissue exhibited a significant accumulation of multiple long chain fatty acids, as well as monoacylglycerols and glycerol (Fig. 4A), which is indicative of increased or altered beta-oxidation (Nomura et al., 2010). Differences in phospholipid metabolism can reflect the growth and turnover of tissue as well as the rise from degradation of membranes during apoptosis (Beloribi-Djefalia et al., 2016; Santos and Schulze, 2012). Notably, citrate, carnitine and carnitine conjugated lipids were significantly lower in lung cancer tissue. Decreased levels of citrate may suggest a limited availability of this metabolite to support lipid synthesis, while reductions in carnitine conjugate lipids may reflect a decrease in lipid transport capacity into the mitochondria (Currie et al., 2013). In summary, these changes are supporting membrane growth and cellular proliferation, which is consistent with the changes in polyamine levels observed.

Another pathway of intense interest in cancer in recent years is the one-carbon metabolism, mainly due to the need of cancer cells to support enhanced proliferation and survival (Ducker and Rabinowitz, 2017; Newman and Maddocks, 2017). In this study, multiple pathway metabolites were significantly altered (glycine, sarcosine, SAH, methionine, homocysteine) (Fig. 4B). Previous literature shows that, to sustain one-carbon supply for proliferation, cancer cells convert serine to glycine, generating methylene-THF (Tibbetts and Appling, 2010). Moreover, it has been suggested that glycine promotes cancer cell growth in lung tumor-initiating cells (Zhang et al., 2012). The significant accumulation of sarcosine may result in increased biogenesis, as supported by SAH, and has been shown to correlate with increased methylation and tumor aggressiveness in other cancers (Cernei et al., 2013).

Finally, and as we discussed above, we observed a significant increase in ribose-5-phosphate levels in tumor tissue. Recently, it has been described that tumor cells redirect glucose flow to generate ribose-5-phosphate in order to increase the synthesis of nucleotides and thus maintain a high growing rate (Ciou et al., 2015). These data, together with the relevant role of nucleotide catabolism for DNA replication, led us to analyze this pathway in detail. Firstly, higher levels of initial products such as AMP were detected in tumor tissues, which were accompanied by the absence of significant changes in GMP (Guanosine monophosphate) (Fig. 5A). These data suggest a shift in the pathway favoring AMP synthesis. The analysis of the differential expression of the enzymes involved in this pathway showed a significant increase in GMPR (*Guanosine Monophosphate Reductase*) and ADSL (*Adenylosuccinate lyase*) expression in SCC and AC as compared to normal tissue (Fig. 7A). The enzyme GMPR catalyzes a reverse reaction which turns GMP into IMP, maintaining this metabolite levels high. Supporting these results, we also found an overexpression of ADSL, the enzyme in charge of AMP synthesis, both at a genic and at a protein level in tumor tissue for AC and SCC cases (Fig. 7). These data prove the existence of an activation of the *de novo* synthesis favoring AMP synthesis, which reflects enhanced ATP/AMP turnover as supported by significantly higher levels of multiple purine catabolic products such as inosine, hypoxanthine, xanthine and xanthosine.

In relation to these results, the ADSL enzyme has been described as relevant to the formation of a complex called purinosome, formed by 6 enzymes in charge of performing ten sequential reactions in the step from PRPP (Phosphoribosyl

pyrophosphate) to IMP (An et al., 2008). This complex is formed under situations of high purine demand in order to increase the metabolic flow of the *de novo* synthesis and to complement the recovery path. Although in some aspects the existence of this complex can be discussed, the alterations in the *de novo* pathway in several human diseases has caused the purinosome to be considered a therapeutic target for clinical treatments (Zhao et al., 2013), including oncology (Zhang et al., 2015). In this sense, other groups have described before that the deficiency of *ADSL* and *ATIC* affects the formation and assembly of purinosome, and there is evidence that both enzymes are key in the regulation of the synthesis pathway of purines during tumor development (Baresova et al., 2012; Jurecka et al., 2015). Our results prove the existence of an increase in the expression of both enzymes at the protein level in lung tumor tissue when compared to healthy tissue from the same patient in SSC and AC. These results are also validated through the analysis of available data from public cancer genomics studies. Furthermore, we show the existence of a clear significant relation between survival and *ATIC* or *ADSL* expression (Fig. 8). The association to opposed survival observed in the expression of *ADSL* depending on the histological subtypes analyzed is especially relevant, since it could be due to a gene with a key role in the differentiation between both histological subtypes. All these data confirm the potential role to explore purinosome as a therapeutic objective against lung cancer.

We also detected an increase in the expression of metabolites involved in the pyrimidine pathway such as cytidine-3' and 5'-monophosphate (CMP), uridine, cytidine, uracil, or 5,6-dihydrouracil (Fig. 5A) in tumors. In this sense, dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), which is the enzyme responsible of the production of 5,6-dihydrouracil as uracil oxidation product in humans, shows a higher activity and expression in lung adenocarcinoma compared with control tissue. Moreover, its activity has also been related to improved efficacy of cytotoxic effects from common postoperative adjuvant therapy NSCLC (Miyoshi et al., 2005; Shintani et al., 2011). Recently, 5,6-dihydrouracil has been shown to be elevated in AC (Wikoff et al., 2015).

Finally, the statistical analysis of the results of the present study evidences the existence of changes in the nucleotide metabolism in lung cancer tissue versus normal tissue, which were particularly more relevant in SCC rather than in AC. In addition, these results also revealed the existence of differences in the levels of metabolites in AC versus SCC cases, which means that both histological subtypes regulate the

nucleotide metabolism in a different manner (Fig. 5B). This fact was supported by the comparison of the metabolites with the highest discrimination capability for AC and SCC (Fig. 5C). In the case of AC, the predictive capability of the top-5 metabolites analyzed was highly relevant. Sensitivity was always above 0.787, while specificity was above 0.818, with a special mention for 5,6-dihydrouracil (Fig. 6A). The predictive capability was even better for the SCC subtype, since sensitivity and specificity values were always above 0.914, with special emphasis on 2'-O-methylguanosine and 5-methyluridine, the two metabolites with the highest discrimination capacity. In fact, the box plots reveal that the concentration range detected for both metabolites in lung tissue did not practically overlap in SCC tissue and the corresponding normal tissue (Fig. 6B). A common trend found for nucleotides was that their concentrations were characterized by a common pattern. They were always more concentrated in the cancerous tissues as compared to normal tissues, both for AC and SCC cases, which is clearly indicative of a hypermetabolism.

5. CONCLUSIONS

In summary, this work provides a detailed analysis of the metabolomic changes taking place in relevant biochemical pathways of the most important histological subtypes of lung cancer, with a special interest in the nucleotide metabolism. Additionally, the obtained results allow the identification of the potential discriminatory role of metabolites for the two most diagnosed lung carcinoma types and, therefore, their possible predictive capability or their use as diagnostic markers. The detailed knowledge of these alterations also opens the door to the discovery of new therapeutic intervention targets.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Consejería de Salud (Junta de Andalucía) (PI- 0650-2010 and PI-0246-2013) and MICINN (SAF2016-75228-R) grants. MLC was supported by an FPU fellowship (FPU13/03393) from Ministerio de Educación. We acknowledge Carmen Cabrero-Doncel for her assistance with the article. In memoriam of Antonio L. Calzado Torres.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PM, CJJ, MGR, MCS, SM and MLC designed, performed the experiments and analyzed data; FPC, AS and EM contributed conceptual input; MAC conceived the study, analyzed data, wrote the manuscript and approved the final version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Aboud, O.A., Weiss, R.H., 2013. New opportunities from the cancer metabolome. *Clinical chemistry* 59, 138-146.
- Ahmad, S., Khan, M.Y., Rafi, Z., Khan, H., Siddiqui, Z., Rehman, S., Shahab, U., Khan, M.S., Saeed, M., Alouffi, S., Khan, M.S., 2017. Oxidation, glycation and glycoxidation-The vicious cycle and lung cancer. *Seminars in cancer biology*.
- An, S., Kumar, R., Sheets, E.D., Benkovic, S.J., 2008. Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science* 320, 103-106.
- Armitage, E.G., Southam, A.D., 2016. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 12, 146.
- Baresova, V., Skopova, V., Sikora, J., Patterson, D., Sovova, J., Zikanova, M., Kmoch, S., 2012. Mutations of ATIC and ADSL affect purinosome assembly in cultured skin fibroblasts from patients with AICA-ribosiduria and ADSL deficiency. *Human molecular genetics* 21, 1534-1543.
- Beloribi-Djefafli, S., Vasseur, S., Guillaumond, F., 2016. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* 5, e189.
- Berezowska, S., Galvan, J.A., Langer, R., Bubendorf, L., Savic, S., Gugger, M., Schmid, R.A., Marti, T.M., 2017. Glycine decarboxylase and HIF-1alpha expression are negative prognostic factors in primary resected early-stage non-small cell lung cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 470, 323-330.
- Calderon-Santiago, M., Priego-Capote, F., Turck, N., Robin, X., Jurado-Gamez, B., Sanchez, J.C., Luque de Castro, M.D., 2015. Human sweat metabolomics for lung cancer screening. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407, 5381-5392.
- Cernei, N., Heger, Z., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Babula, P., Eckschlager, T., Stiborova, M., Kizek, R., Adam, V., 2013. Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker--a review. *International journal of molecular sciences* 14, 13893-13908.

Ciou, S.C., Chou, Y.T., Liu, Y.L., Nieh, Y.C., Lu, J.W., Huang, S.F., Chou, Y.T., Cheng, L.H., Lo, J.F., Chen, M.J., Yang, M.C., Yuh, C.H., Wang, H.D., 2015. Ribose-5-phosphate isomerase A regulates hepatocarcinogenesis via PP2A and ERK signaling. *International journal of cancer* 137, 104-115.

Corti, A., Franzini, M., Paolicchi, A., Pompella, A., 2010. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting. *Anticancer research* 30, 1169-1181.

Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T.C., Farese, R.V., Jr., 2013. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell metabolism* 18, 153-161.

Ducker, G.S., Rabinowitz, J.D., 2017. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell metabolism* 25, 27-42.

Evans, A.M., DeHaven, C.D., Barrett, T., Mitchell, M., Milgram, E., 2009. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Analytical chemistry* 81, 6656-6667.

Fahrmann, J.F., Grapov, D.D., Wanichthanarak, K., DeFelice, B.C., Salemi, M.R., Rom, W.N., Gandara, D.R., Phinney, B.S., Fiehn, O., Pass, H., Miyamoto, S., 2017. Integrated Metabolomics and Proteomics Highlight Altered Nicotinamide- and Polyamine Pathways in Lung Adenocarcinoma. *Carcinogenesis*.

Falco, M., Palma, G., Rea, D., De Biase, D., Scala, S., D'Aiuto, M., Facchini, G., Perdona, S., Barbieri, A., Arra, C., 2016. Tumour biomarkers: homeostasis as a novel prognostic indicator. *Open biology* 6.

Fan, T.W., Lane, A.N., Higashi, R.M., Farag, M.A., Gao, H., Bousamra, M., Miller, D.M., 2009. Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Molecular cancer* 8, 41.

Gamcsik, M.P., Kasibhatla, M.S., Teeter, S.D., Colvin, O.M., 2012. Glutathione levels in human tumors. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 17, 671-691.

Gerner, E.W., Meyskens, F.L., Jr., 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* 4, 781-792.

Grimminger, P.P., Schneider, P.M., Metzger, R., Vallbohmer, D., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Holscher, A.H., Brabender, J., 2010. Ornithine decarboxylase mRNA expression in curatively resected non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer* 11, 114-119.

Haznadar, M., Cai, Q., Krausz, K.W., Bowman, E.D., Margono, E., Noro, R., Thompson, M.D., Mathe, E.A., Munro, H.M., Steinwandel, M.D., Gonzalez, F.J., Blot, Molecular Oncology (2018) © 2018 The Authors. Published by FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd

W.J., Harris, C.C., 2016. Urinary Metabolite Risk Biomarkers of Lung Cancer: A Prospective Cohort Study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 25, 978-986.

Hori, S., Nishiumi, S., Kobayashi, K., Shinohara, M., Hatakeyama, Y., Kotani, Y., Hatano, N., Maniwa, Y., Nishio, W., Bamba, T., Fukusaki, E., Azuma, T., Takenawa, T., Nishimura, Y., Yoshida, M., 2011. A metabolomic approach to lung cancer. *Lung cancer* 74, 284-292.

Jackson, L.M., Hue, J.J., Winograd, N., 2013. Quantitative Detection of Purines in Biologically-Relevant Films with TOF-Secondary Ion Mass Spectrometry. *Surface and interface analysis : SIA* 45, 237-239.

Jiang, P., Du, W., Wu, M., 2014. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell* 5, 592-602.

Jordan, K.W., Adkins, C.B., Su, L., Halpern, E.F., Mark, E.J., Christiani, D.C., Cheng, L.L., 2010. Comparison of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung by metabolomic analysis of tissue-serum pairs. *Lung cancer* 68, 44-50.

Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International journal of molecular sciences* 13, 3145-3175.

Jurecka, A., Zikanova, M., Kmoch, S., Tylki-Szymanska, A., 2015. Adenylosuccinate lyase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 38, 231-242.

Kami, K., Fujimori, T., Sato, H., Sato, M., Yamamoto, H., Ohashi, Y., Sugiyama, N., Ishihama, Y., Onozuka, H., Ochiai, A., Esumi, H., Soga, T., Tomita, M., 2013. Metabolomic profiling of lung and prostate tumor tissues by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* 9, 444-453.

Krepela, E., Prochazka, J., Karova, B., Cermak, J., Roubkova, H., 1997. Cathepsin B, thiols and cysteine protease inhibitors in squamous-cell lung cancer. *Neoplasma* 44, 219-239.

Krumsiek, J., Suhre, K., Evans, A.M., Mitchell, M.W., Mohny, R.P., Milburn, M.V., Wagele, B., Romisch-Margl, W., Illig, T., Adamski, J., Gieger, C., Theis, F.J., Kastenmuller, G., 2012. Mining the unknown: a systems approach to metabolite identification combining genetic and metabolic information. *PLoS genetics* 8, e1003005.

Kumar, N., Shahjaman, M., Mollah, M.N.H., Islam, S.M.S., Hoque, M.A., 2017. Serum and Plasma Metabolomic Biomarkers for Lung Cancer. *Bioinformation* 13, 202-208.

Lehner, R., Quiroga, A.D., 2016. Chapter 5 - Fatty Acid Handling in Mammalian Cells A2 - Ridgway, Neale D, in: McLeod, R.S. (Ed.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Sixth Edition). Elsevier, Boston, pp. 149-184.

Lin, J., Lee, J.H.J., Paramasivam, K., Pathak, E., Wang, Z., Pramono, Z.A.D., Lim, B., Wee, K.B., Surana, U., 2017. Induced-Decay of Glycine Decarboxylase Transcripts as an Anticancer Therapeutic Strategy for Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Molecular therapy*. *Nucleic acids* 9, 263-273.

Louis, E., Cantrelle, F.X., Mesotten, L., Reekmans, G., Bervoets, L., Vanhove, K., Thomeer, M., Lippens, G., Adriaenssens, P., 2017. Metabolic phenotyping of human plasma by (1) H-NMR at high and medium magnetic field strengths: a case study for lung cancer. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* 55, 706-713.

Miyoshi, T., Kondo, K., Fujino, H., Takahashi, Y., Sawada, N., Sakiyama, S., Tsuyuguchi, M., Kimura, S., Sumitomo, M., Monden, Y., 2005. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in non-small cell lung cancer: relationship between mRNA expression and activity. *Anticancer research* 25, 923-930.

National Lung Screening Trial Research, T., Aberle, D.R., Adams, A.M., Berg, C.D., Black, W.C., Clapp, J.D., Fagerstrom, R.M., Gareen, I.F., Gatsonis, C., Marcus, P.M., Sicks, J.D., 2011. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *The New England journal of medicine* 365, 395-409.

Newman, A.C., Maddocks, O.D.K., 2017. One-carbon metabolism in cancer. *British journal of cancer* 116, 1499-1504.

Nomura, D.K., Long, J.Z., Niessen, S., Hoover, H.S., Ng, S.W., Cravatt, B.F., 2010. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell* 140, 49-61.

O'Shea, K., Cameron, S.J., Lewis, K.E., Lu, C., Mur, L.A., 2016. Metabolomic-based biomarker discovery for non-invasive lung cancer screening: A case study. *Biochimica et biophysica acta* 1860, 2682-2687.

Pegg, A.E., 2009. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB life* 61, 880-894.

Poisson, L.M., Munkarah, A., Madi, H., Datta, I., Hensley-Alford, S., Tebbe, C., Buekers, T., Giri, S., Rattan, R., 2015. A metabolomic approach to identifying platinum resistance in ovarian cancer. *Journal of ovarian research* 8, 13.

Rafikova, O., Meadows, M.L., Kinchen, J.M., Mohny, R.P., Maltepe, E., Desai, A.A., Yuan, J.X., Garcia, J.G., Fineman, J.R., Rafikov, R., Black, S.M., 2016. Metabolic Changes Precede the Development of Pulmonary Hypertension in the Monocrotaline Exposed Rat Lung. *PloS one* 11, e0150480.

Rath, M., Muller, I., Kropf, P., Closs, E.I., Munder, M., 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Frontiers in immunology* 5, 532.

Reitman, Z.J., Jin, G., Karoly, E.D., Spasojevic, I., Yang, J., Kinzler, K.W., He, Y., Bigner, D.D., Vogelstein, B., Yan, H., 2011. Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 3270-3275.

Rocha, C.M., Barros, A.S., Gil, A.M., Goodfellow, B.J., Humpfer, E., Spraul, M., Carreira, I.M., Melo, J.B., Bernardo, J., Gomes, A., Sousa, V., Carvalho, L., Duarte, I.F., 2010. Metabolic profiling of human lung cancer tissue by 1H high resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *Journal of proteome research* 9, 319-332.

Rocha, C.M., Barros, A.S., Goodfellow, B.J., Carreira, I.M., Gomes, A., Sousa, V., Bernardo, J., Carvalho, L., Gil, A.M., Duarte, I.F., 2015. NMR metabolomics of human lung tumours reveals distinct metabolic signatures for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 36, 68-75.

Santos, C.R., Schulze, A., 2012. Lipid metabolism in cancer. *The FEBS journal* 279, 2610-2623.

Shintani, Y., Inoue, M., Funakoshi, Y., Matsumura, A., Ohta, M., Maeda, H., Okumura, M., 2011. Low dihydropyrimidine dehydrogenase correlates with prolonged survival in patients with lung adenocarcinoma treated with 5-fluorouracil. *Anticancer research* 31, 4665-4671.

Tian, H., Li, L., Liu, X.X., Zhang, Y., 2006. Antitumor effect of antisense ornithine decarboxylase adenovirus on human lung cancer cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 38, 410-416.

Tibbetts, A.S., Appling, D.R., 2010. Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annual review of nutrition* 30, 57-81.

Wells, S.M., Buford, M.C., Migliaccio, C.T., Holian, A., 2009. Elevated asymmetric dimethylarginine alters lung function and induces collagen deposition in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 40, 179-188.

Wheatley, D.N., Campbell, E., 2002. Arginine catabolism, liver extracts and cancer. *Pathology oncology research : POR* 8, 18-25.

Wikoff, W.R., Grapov, D., Fahrman, J.F., DeFelice, B., Rom, W.N., Pass, H.I., Kim, K., Nguyen, U., Taylor, S.L., Gandara, D.R., Kelly, K., Fiehn, O., Miyamoto, S., 2015. Metabolomic markers of altered nucleotide metabolism in early stage adenocarcinoma. *Cancer prevention research* 8, 410-418.

Zhang, A., Sun, H., Yan, G., Wang, P., Wang, X., 2015. Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic. *BioMed research international* 2015, 354671.

Zhang, W.C., Shyh-Chang, N., Yang, H., Rai, A., Umashankar, S., Ma, S., Soh, B.S., Sun, L.L., Tai, B.C., Nga, M.E., Bhakoo, K.K., Jayapal, S.R., Nichane, M., Yu, Q., Ahmed, D.A., Tan, C., Sing, W.P., Tam, J., Thirugananam, A., Noghabi, M.S., Pang, Y.H., Ang, H.S., Mitchell, W., Robson, P., Kaldis, P., Soo, R.A., Swarup, S., Lim, E.H., Lim, B., 2012. Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* 148, 259-272.

Zhao, H., French, J.B., Fang, Y., Benkovic, S.J., 2013. The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans. *Chemical communications* 49, 4444-4452.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Heatmap representation of the metabolite levels obtained from each metabolomic assay. In figure A, the values are scaled using the Z-Score. The Y-axis order (metabolites) reflects the statistical difference between metabolite levels in tumor and normal tissues at super pathway and metabolite levels. The X-axis order (sample) is set after applying a hierarchical clustering algorithm, using UPGMA as method and 1-Pearson's Correlation as metric. Figure B shows the log transformed tumor/normal tissue ratios (logFC) for both carcinomas ordered by statistical difference between metabolite level changes at super pathway and metabolite levels.

Fig. 2. Glucose metabolism pathway. Heatmap shows the mean of the log transformed tumor/normal ratios for metabolites in adenocarcinoma (orange) and squamous cell cancer (blue). Red and green colors indicate metabolite level increase or decrease, respectively. *P-Value < 0.05, **P-Value < 0.01 and ***P-Value < 0.001.

Fig. 3. Glutathione (A) and Polyamines (B) metabolism pathways. Heatmaps show the mean of the log transformed tumor/normal ratios for metabolites in adenocarcinoma (orange) and squamous cell cancer (blue). Red and green colors indicate metabolite level increase or decrease, respectively. *P-Value < 0.05, **P-Value < 0.01 and ***P-Value < 0.001.

Fig. 4. Fatty acids (A) and Carbon (B) metabolism pathways. Heatmaps show the mean of the log transformed tumor/normal ratios for metabolites in adenocarcinoma (orange) and squamous cell cancer (blue). Red and green colors indicate metabolite level increase or decrease, respectively. *P-Value < 0.05, **P-Value < 0.01 and ***P-Value < 0.001.

Fig. 5. A) Nucleotide metabolism pathway. Heatmap shows the mean of the log transformed tumor/normal ratios for metabolites in adenocarcinoma (orange) and squamous cell cancer (blue). Red and green colors indicate metabolite level increase or decrease, respectively. *P-Value < 0.05, **P-Value < 0.01 and ***P-Value < 0.001. B) PLS-DA obtained for AC and SCC tissues using significant nucleotides and metabolites between normal and cancerous tissue. The data sets included those metabolites statistically significant in AC and SCC versus normal tissue, 37 and 61 metabolites for AC and SCC, respectively. The third PLS-DA was obtained using the fold change value of each metabolite between normal and cancerous tissue in order to compare both types of carcinomas. For this purpose, we only considered those metabolites that were commonly altered in AC and SCC cases versus normal tissue, 34 metabolites. C) Top-ten nucleotides and derivatives ranked by their discrimination capability (expressed as mean decrease accuracy) provided by Random Forest analysis for AC and SCC cases.

Fig. 6. Box plots and ROC curves obtained for the top-five nucleotides and metabolites to discriminate between normal and cancerous tissue according to the Random Forest analysis for AC (A) and SCC (B). The area under the curve (AUC) is also shown, as well as the sensitivity and specificity for the threshold providing highest accuracy.

Fig. 7. Purine metabolism and expression of *ATIC* and *ADSL*. A) Total RNA was extracted from AC and SCC tissues, integrity evaluated and changes in expression of the indicated genes in tumor samples compared to normal lung samples from the same patient analyzed by qPCR and expressed as a fold-change. Amplification efficiencies were validated and normalized against β actin T, and fold change in gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Results represent the mean \pm SD. B) Genetic alterations in *ADSL* and *ATIC* genes in AC and SCC human samples. Data from TCGA were analyzed using cBioportal software. Each column represents a patient and displays only the % of altered cases. C) Expression of *ADSL* and *ATIC* in AC and SCC analyzed by immunohistochemistry. Representative images of lung tumor and adjacent normal tissue stained with *ADSL* or *ATIC* antibody (x20) and hematoxylin–eosin

(HE)(x20). D) ATIC and ASDL expression in AC and SCC compared to surrounding healthy tissue. Expression was quantified as detailed in material and methods. The results are expressed as relative intensity values and represent the mean \pm SD. * P-Value < 0.05.

Fig. 8. Association between *ADSL/ATIC* gene expression and survival in lung cancer cohorts. Kaplan–Meier plots for *ADSL* and *ATIC* gene expression (high and low levels) in lung cancer cohorts available from KMplotter (n=724 for AC and n= 524 for SCC). Log-rank p values and hazard ratios (HRs; 95 % confidence interval in parentheses) are shown. The p-value represents the equality of survival curves based on a log-rank test.

Table 1. Patient characteristics.

Supporting Information

Fig. S1. Unsupervised analysis by PCA applied to the complete dataset.

Fig. S2. Unsupervised analysis by PCA applied to the nucleotide metabolic pathway for AC and SCC versus normal tissue.

Fig. S3. PLS-DA models.

Fig. S4. Enzymes involved in the regulation of purine catabolism.

Supplementary Data 1. Data set with total different metabolic profiles obtained for AC and SSC. (Excel file)

Characteristics	Adenocarcinoma (n=33)	Squamous cell (n=35)	p-Value
Age (Mean)	62.11±9.73	68.71±7.46	0.002
Sex			
Male	24	35	0.032
Female	9	0	
Comorbidities	26	33	0.018
Neoplasms	8	2	0.54
Metastases in follow-up	3	2	0.005
Tumor size	3.52±1.98	4.5±2.01	0.039
SUV(max)*	11.07±8.19	13.4±5.73	0.15
pTNM			
IA	10	5	0.38
IB	7	12	
IIA	6	7	
IIB	4	6	
IIIA	5	5	
IIIB	1	0	
Grade Differentiation			
I	4	2	0.11
II	16	16	
III	11	6	
N.S.	2	11	

Table 1. Patient characteristics.

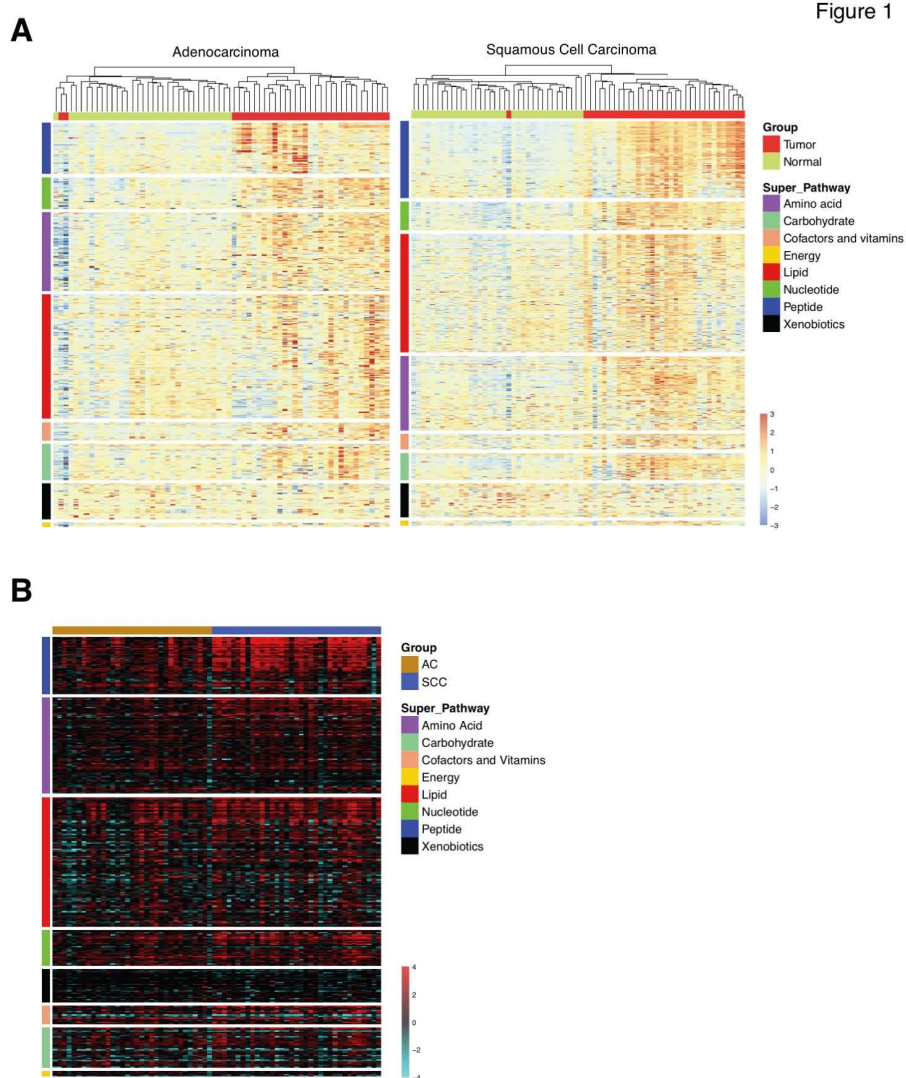


Figure 1

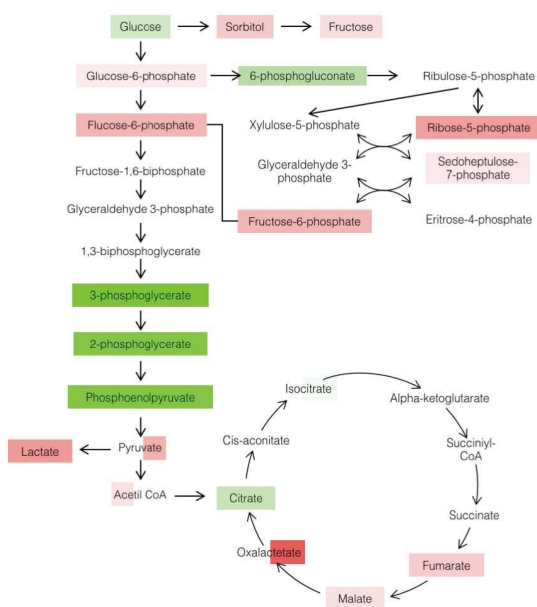
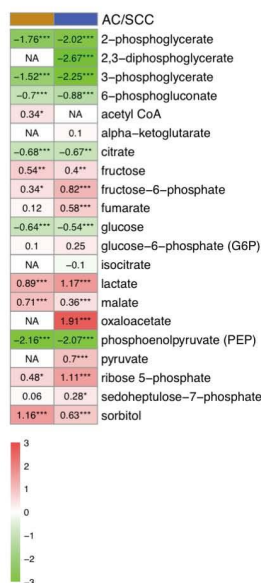


Figure 2

A

		AC/SCC
0	0.22	5-oxoproline
0.63**	1.09***	cystathionine
1.01***	1.75***	cysteine
-0.29	0.9***	cysteinylglycine
NA	-0.04	gamma-glutamylalanine
NA	2.75***	gamma-glutamylcysteine
-0.42*	-0.67***	gamma-glutamylglutamate
-0.33*	-0.07	gamma-glutamylglutamine
NA	1.25***	gamma-glutamylisoleucine
0.31*	0.44**	gamma-glutamylleucine
NA	0.25	gamma-glutamyllysine
-0.03	0.05	gamma-glutamylmethionine
0.19	0.52***	gamma-glutamylphenylalanine
NA	0.32**	gamma-glutamylthreonine
NA	1.07***	gamma-glutamyltryptophan
-0.1	0.11	gamma-glutamyltyrosine
0.24	1.07***	gamma-glutamylvaline
0.31***	0.54***	glutamate
-0.54	1.41***	glutathione, oxidized (GSSG)
0.85*	3.94***	glutathione, reduced (GSH)
0.27**	0.54***	glycine

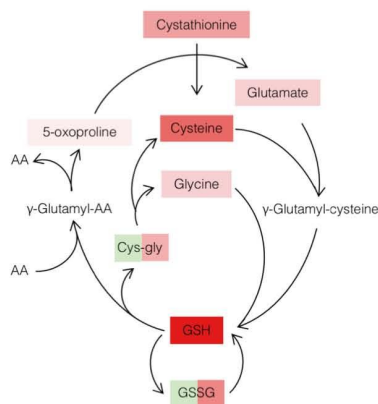
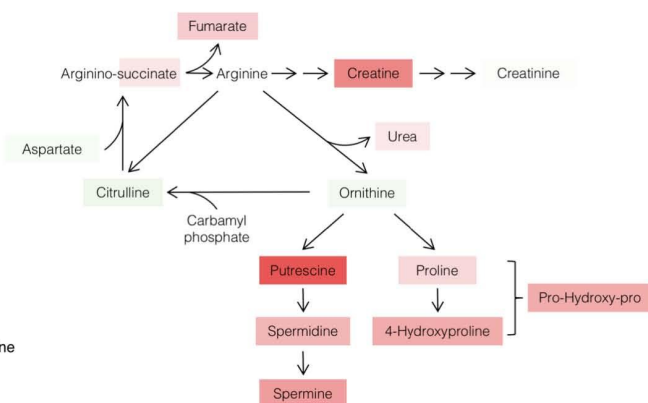


Figure 3

B

		AC/SCC
0.14	0.02	arginine
NA	0.3*	argininosuccinate
-0.27*	-0.07	aspartate
-0.21	-0.16	citulline
0.52***	1.38***	creatine
0.09*	-0.03	creatinine
0.12	0.58***	fumarate
-0.16	-0.12	ornithine
0.95***	1.52***	pro-hydroxy-pro
0.38***	0.46***	proline
1.71***	1.99***	putrescine
0.41**	0.83***	spermidine
0.34**	1.11**	spermine
0.41***	0.95***	trans-4-hydroxyproline
0.21	0.27***	urea



A

		AC/SCC
0.7**	0.74***	1-linoleoylglycerol (1-monolinolein)
0.32*	0.53***	1-palmitoylglycerol (1-monopalmitin)
0.4**	0.4***	1-stearoylglycerol (1-monostearin)
0.95***	1.01***	1-stearoylglycerophosphoinositol
0.54**	0.83***	10-heptadecenoate (17:1n7)
1.04***	1.74***	10-nonadecenoate (19:1n9)
1.34***	1.05***	2-linoleoylglycerol (2-monolinolein)
0.68**	1.42***	2-palmitoylglycerol (2-monopalmitin)
0.18	0.12	3-hydroxybutyrate (BHBA)
0.34*	NA	acetyl CoA
-0.32**	-0.34***	acetylcarnitine
-0.27*	-0.39***	carnitine
0.02	0.03	choline
0.84***	0.34*	choline phosphate
-0.68***	-0.67**	citrate
2.16***	3.8***	cytidine 5'-diphosphocholine
-0.22*	-0.54***	deoxycarnitine
0.96***	1.98***	eicosenoate (20:1n9 or 11)
0.48**	0.63***	ethanolamine
0.42***	0.96***	glycerol
0.31*	1.37***	glycerol 3-phosphate (G3P)
1.41***	1.7***	glycerophosphorylcholine (GPC)
-0.5**	-0.23	laurylcarnitine
0.51***	0.45***	myristate (14:0)
-0.91***	-0.41	octanoylcarnitine
0.04	0.48***	oleate (18:1n9)
0.22	0.41***	palmitate (16:0)
0.4*	0.91***	palmitoleate (16:1n7)
0.84***	0.47***	phosphoethanolamine
-0.51**	-0.74***	propionylcarnitine
NA	0.7***	pyruvate
0.3**	0.53***	stearate (18:0)

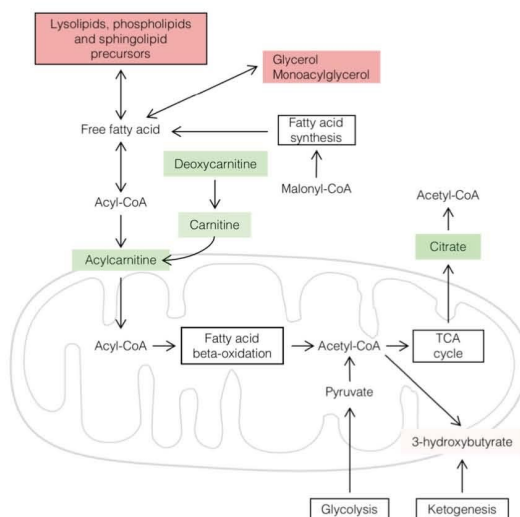
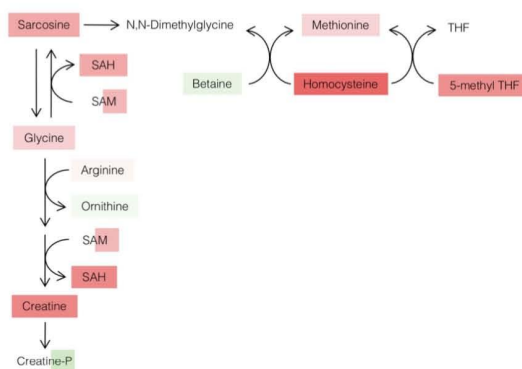


Figure 4

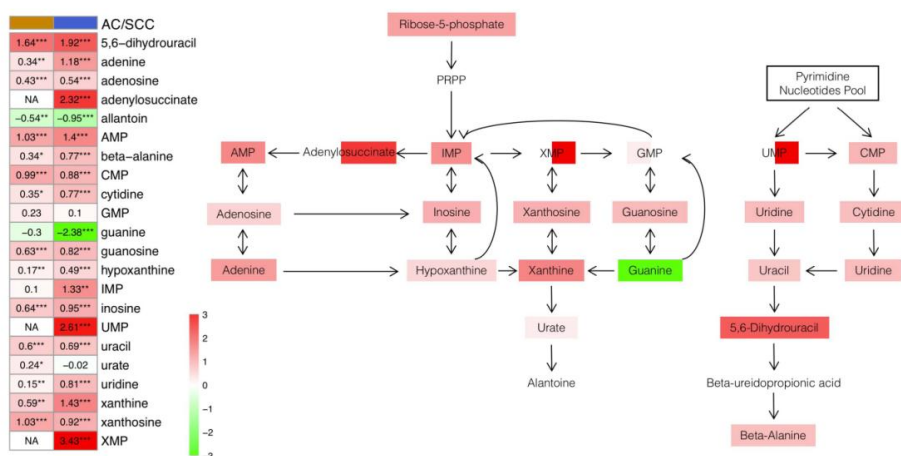
B

		AC/SCC
0.65***	1.27***	5-methyltetrahydrofolate (5MeTHF)
0.14	0.02	arginine
-0.33**	-0.26**	betaine
0.52***	1.38***	creatine
NA	-0.52*	creatine phosphate
0.27**	0.54***	glycine
0.85***	1.77***	homocysteine
0.37***	0.5***	methionine
-0.16	-0.12	ornithine
0.9***	1.36***	S-adenosylhomocysteine (SAH)
NA	0.82***	S-adenosylmethionine (SAM)
0.32**	1***	sarcosine (N-Methylglycine)

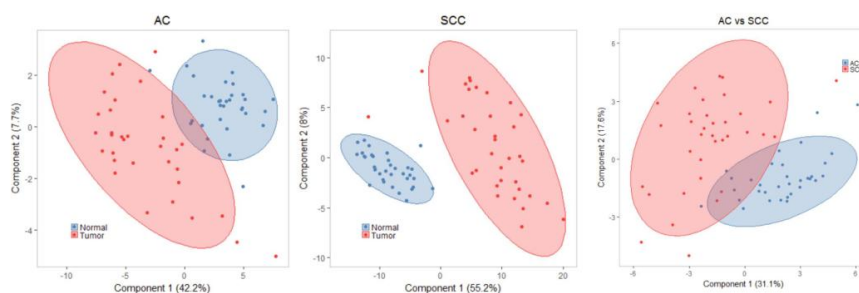


A

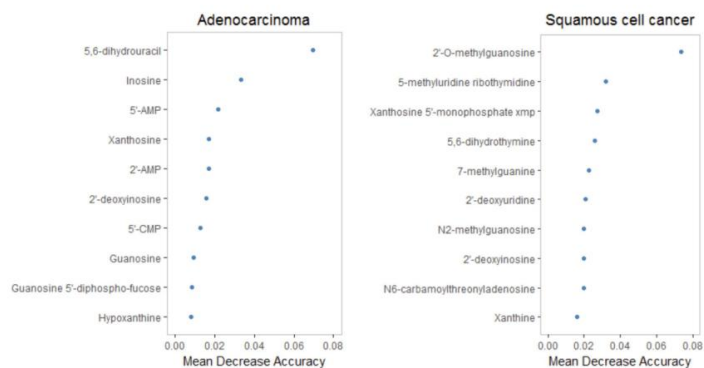
Figure 5



B



C



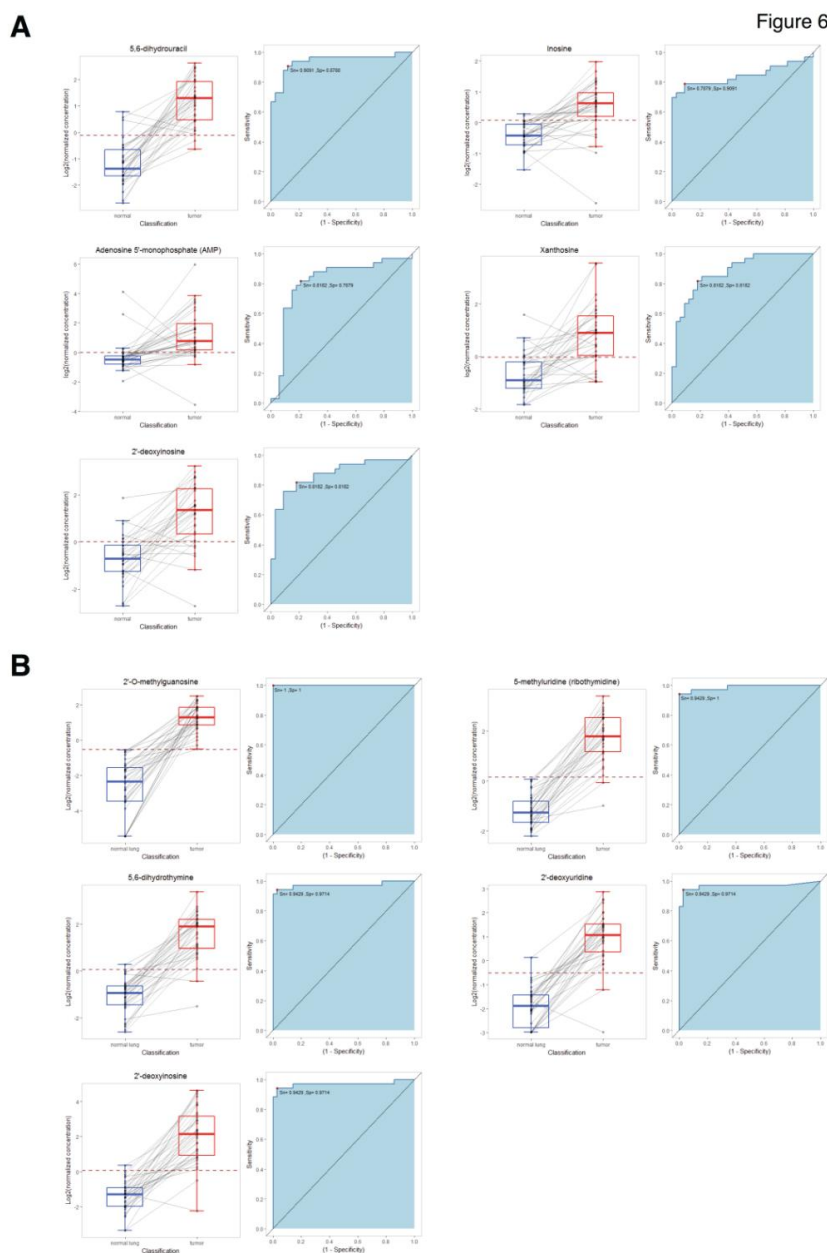


Figure 7

